ANNALES
DE
L'INSTITUT NATIONAL
DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE

ANNALES DE L'INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

SÉRIE E

ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

CONSERVATION ET TRANSFORMATION DES PRODUITS AGRICOLES

Année 1957

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
7, rue Keppler – Paris

ÉTUDE ET CLASSIFICATION DES LEVURES DE VIN DE LA GIRONDE

PAR

Mlle Simone DOMERCQ

PLAN DU MÉMOIRE

Introduction.

CHAPITRE PREMIER

HISTORIQUE

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES D'ISOLEMENT ET DE CLASSIFICATION

I. — Technique des prélèvements.
II. — Technique des isolements.
III. — Etude des levures isolées.
A. — Examen des caractères morphologiques.
B. — Examen des caractères physiologiques.

CHAPITRE III

DESCRIPTION DES ESPÈCES DE LEVURES ISOLÉES

I. — Levures sporogènes.
Genre Saccharomyces.
Genre Saccharomycodes.
Genre Torulaspora.
Genres Hansenula et Pichia.
Genre Debaryomyces.
II. — Levures non sporogènes.

CHAPITRE IV

LEVURES DES RÉGIONS DE VINS ROUGES

I. — Région du Médoc.
II. — Régions du Libournais, des Graves et des Premières Côtes.

CHAPITRE V

LEVURES DES RÉGIONS DE VINS BLANCS

I. — Régions de raisins blancs non pourris.
II. — Levures des régions de pourriture noble.

CHAPITRE VI

RÉCAPITULATION DES LEVURES DE VINIFICATION

CHAPITRE VII

LEVURES ISOLÉES DE VINS

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Parmi les industries de la fermentation, la vinification et la brasserie ont été souvent comparées, puisque toutes deux conduisent à des boissons alcoolisées. Cependant, ces deux industries diffèrent considérablement et les acquisitions faites pour l'une profitent peu à l'autre. La brasserie, en effet, travaille sur une matière première disponible en tout temps et dont la composition est à peu près constante. Au contraire, le raisin mûr, matière première de la vinification, n'existe que deux ou trois semaines en automne, ce qui impose un rythme saisonnier à cette industrie. De plus, la composition du moût varie selon les années, les cépages et les régions. On ne peut absolument pas la modifier puisque le moût doit rester un produit naturel pour que le vin conserve sa définition.

Enfin, contrairement au moût de bière qui subit une stérilisation avant d'être ensemencé avec des cultures de levures pures soigneusement sélectionnées, le moût de raisin fermente spontanément sous l'action d'une microflore variée et peu connue, sur laquelle on ne peut guère agir.

Il n'est pas certain d'ailleurs qu'il y ait intérêt à modifier complètement la microflore naturelle des raisins : elle est le résultat d'adaptation à divers facteurs qui ont abouti à un équilibre écologique que l'homme ne peut pas transformer facilement. Cette microflore spontanée a du reste produit jusqu'à ce jour des vins dont les qualités se sont fait reconnaître au cours des siècles. C'est peut-être pour ces raisons qu'acceptant la fermentation telle qu'elle se produit naturellement, les œnologues ont plutôt

cherché, semble-t-il, à conserver les qualités des vins et se sont consacrés aux problèmes de stabilisation, de vieillissement. La nécessité de la connaissance de la composition du vin a amené à considérer le point de vue chimique de la fermentation. Les travaux de L. GENEVOIS (46) font date dans ce domaine : ils établissent le bilan de la fermentation et l'utilisent pour une première classification des levures. Mais d'une façon générale le problème microbiologique de la fermentation a été peu étudié et pratiquement, la fermentation du raisin est à peine dirigée.

Pour les mêmes raisons, un autre problème se pose en Gironde, celui de la conservation des vins liquoreux. Ces vins nécessitent l'emploi de l'anhydride sulfureux, ce qui au-dessus d'une certaine dose, nuit à leur dégustation. Avant de rechercher divers procédés de conservation, il semble que le véritable problème soit celui de l'étude des levures qui se maintiennent actives longtemps dans les vins et provoquent leur refermentation.

Une meilleure connaissance des levures que l'on trouve sur les raisins et qui font le vin, s'impose donc. C'est dans cette intention que nous avons entrepris ce travail qui s'est poursuivi pendant cinq années. Nous avons étudié tout d'abord les levures de raisins prélevés à la propriété dans les régions d'appellation contrôlée du Bordelais, puis les levures qui provoquent les refermentations des vins liquoreux.

CHAPITRE PREMIER

HISTORIQUE

Au cours de ses travaux, PASTEUR a montré que la fermentation alcoolique est due à l'activité des levures, petits organismes plus ou moins arrondis ou elliptiques, que l'on trouve en abondance dans le dépôt des liquides en fermentation. Depuis lors, de nombreux chercheurs de divers pays ont étudié les levures et il existe une volumineuse bibliographie sur ce sujet.

A l'origine de ces travaux, se trouvent les méthodes de culture pure qui ont permis d'obtenir des espèces définies et distinctes. En 1881, HANSEN, par dilutions successives en milieu liquide, aboutit à l'isolement d'une cellule unique.

KOCH, en 1883, utilise la méthode des milieux solides : il disperse les cellules dans un milieu liquide qu'il fixe par solidification. Il obtient ainsi des colonies d'origine monocellulaire, qu'il est facile d'isoler. Peu à peu, ces méthodes sont améliorées ou complétées : en 1886, HANSEN opère comme KOCH mais sans lamelle, sous le microscope. LINDNER en

1883 réalise la culture en goutte pendante et en 1893 il met au point la technique des colonies géantes, créant ainsi un nouveau moyen de différenciation des levures.

Ces méthodes ont conduit à la découverte d'un grand nombre d'espèces dont la multiplicité et la variété justifiaient un essai de classification. Pour cela, il était nécessaire de connaître et de rechercher les caractères particuliers de chaque espèce. La taxinomie des levures a donné lieu à une série de travaux très importants.

Etudes taxinomiques générales.

Parmi les premières, citons celle de GUILLIERMOND en 1928 (49), qui donne une description des méthodes employées et une classification des levures.

Puis viennent les travaux plus détaillés de STELLING-DEKKER, en 1931 (107), sur les levures sporogènes, de LODDER en 1934 (60), et de DIDDENS et LODDER en 1942 (36), sur les levures asporogènes.

En 1936, GLAUBITZ et LANEAU (47) réalisent un atlas des organismes de fermentation comprenant une description morphologique et physiologique des levures. CIFERRI et VERONA donnent en 1948 (33) une clé analytique des levures du raisin, du moût et du vin.

Tous les travaux de description, d'identification et de classification réalisés dans le monde entier, par des méthodes codifiées, aboutissent en 1952 à l'ouvrage que LODDER et K-VAN RIJ publient à la suite de leurs études sur la collection des levures du « Centraalbureau voor Schimmelcultures » (C. B. S.) de Delft (61). Cette Taxinomie des levures remise à jour en 1954 (62), est maintenant la base de toutes les recherches sur ces organismes.

Avec un but différent, MRAK et PHAFF font en 1948 (72) une étude très complète des levures isolées sur les substrats les plus divers. Ces auteurs considèrent la phylogénie, la génétique, les méthodes d'étude, la taxinomie et l'écologie des levures et citent une volumineuse bibliographie. En 1951, WICKERHAM (124) publie également un important travail de taxinomie des levures. Il décrit les méthodes employées pour les identifier et les classer, il codifie en particulier la composition des milieux spéciaux d'études afin que les descriptions et les tests soient comparables. Il accorde plus d'importance aux caractères physiologiques, beaucoup moins variables que les caractères morphologiques. A la suite de cette étude générale, il donne une classification du genre *Hansenula* selon les méthodes qu'il a décrites dans la première partie.

Dans le même ordre d'idées, on peut citer le travail de KIRSOP en 1954 (54) sur la « National Collection » des levures d'Angleterre ; cet auteur décrit les procédés de classification, de contrôle, de conservation

employés à la « Brewing Industrial Research Foundation » et discute la valeur des tests utilisés, soit pour la classification soit pour le contrôle.

En 1954, paraît également un ouvrage de A. LUND sur l'Ecologie des levures (63). Il cherche notamment à établir le cycle de vie des levures au cours de l'année, et décrit les espèces isolées et identifiées. Toutefois il s'agit des levures existant dans la nature dont certaines ne sont pas capables de provoquer la fermentation.

Levures de vin.

Après les travaux de Pasteur sur l'importance des cultures pures en brasserie (78), on a songé à appliquer les mêmes méthodes à la vinification : les accidents de fermentation que l'on déplorait trop souvent justifiaient cette application. Peu à peu, à la suite des travaux d'un grand nombre de chercheurs, on a conseillé l'emploi des levains d'espèces sélectionnées, mais les résultats obtenus n'ont pas toujours été satisfaisants : c'est que la vinification se pratique dans des conditions très différentes de celles de la brasserie : pour avoir une fermentation pure du raisin, il ne s'agit pas seulement d'empêcher la contamination par des espèces nuisibles à la qualité et à la conservation du produit final, mais il faut aussi arrêter le développement des germes naturels du raisin, afin que les espèces sélectionnées produisent réellement la fermentation.

Dès 1884, divers procédés étaient préconisés : pasteurisation, sulfitage, mais il fallait éviter les modifications de goût qu'ils produisaient sur le moût. C'est pourquoi ROMMIER (88) conseillait d'ensemencer avec un levain suffisamment actif, assez tôt pour que les levures sélectionnées prennent possession du milieu avant que les levures sauvages et autres microorganismes aient commencé à se développer. En 1899, ROY-CHEVRIER (95) et ROSENSTHIEL (89) essaient de mettre au point une méthode de stérilisation par chauffage qui n'altère pas le goût, ne soit pas trop onéreuse et soit efficace.

Cependant, certains cherchent à savoir si toutes les levures sauvages sont à rejeter. En 1894, MULLER-THURGAU (73) compare les résultats de fermentations conduites par des levures apiculées seules, par des levures elliptiques seules, et par un mélange des deux espèces. Il conclut que les levures apiculées sont nuisibles car elles donnent peu d'alcool et beaucoup d'acidité volatile et de produits secondaires. En 1909, MARTINAND (67) étudie la microflore des moûts en fermentation et compare les résultats obtenus par une fermentation dirigée avec des levures elliptiques seules et par une fermentation naturelle avec la succession habituelle des levures apiculées et elliptiques ; il conclut à l'intérêt d'un levurage.

Levures sélectionnées.

On s'intéresse aux caractères organoleptiques transmis au vin par les différentes espèces de levures : on entrevoit même la possibilité de donner le bouquet d'un vin fin à un vin commun grâce aux levures fermentatives (PASTEUR, puis ROMMIER), mais ce résultat ne devait jamais être atteint. ROSENSTHIEL montre le rapport, d'une part, entre la nature du bouquet et le cépage et,d'autre part, entre l'intensité du bouquet et la levure, ce qu'à la même époque la théorie d'EHRLICH permet d'expliquer en montrant que les substances constitutives du bouquet sont issues des acides aminés fermentés par la levure. D'une façon générale, les résultats obtenus par levurage sont assez peu concluants car ils sont variables, et dans les cas où l'addition de levures sélectionnées a montré un avantage dans la production de l'alcool, il n'y a pas forcément amélioration de la qualité du vin ; on obtient en outre une uniformisation du bouquet qui ne convient nullement aux vins fins et n'est profitable qu'aux vins de consommation courante ou de qualité moyenne.

Cependant, cette question, par sa complexité, a continué à intéresser les chercheurs : MUSSO en 1914 puis en 1932 (74, 75), VENTRE en 1934 (112), MOREAU et VINET en 1935 (68), MARTEAU et GALZY en 1954 (66), en France ; CASTELLI en 1942 (19) et 1948 (22, 23), ROTINI en 1952 (94), VERONA en 1952 (117), CANTARELLI en 1953 (11), en Italie ; MARQUES-GOMES au Portugal en 1949 (65), STEINBERG (105), puis GALLAY, BENVEGNIN et CAPT (41) en 1952 en Suisse ; SCHULLE en Allemagne (100, 101, 102) et SALLER en Autriche (96), RANKINE en Australie (84) ont étudié l'influence des levures sélectionnées, ou des associations de levures simultanées ou échelonnées, sur la qualité des vins obtenus. Pour certains, les meilleurs résultats sont obtenus en employant les cultures pures isolées des meilleurs crus d'une région, sur les moûts de cette même région. Mais, d'autres chercheurs engagent à ne pas attendre de la pratique du levurage plus qu'elle ne peut donner ; elle aboutit à une plus grande sécurité, mais non à une amélioration appréciable du bouquet et du caractère des vins. En résumé, la question n'est pas encore résolue et en fait, l'emploi des cultures pures ne s'est pas généralisé.

Travaux sur les levures des régions viticoles françaises

En réalité, il faut connaître suffisamment bien les levures de chaque région pour pouvoir les utiliser au mieux. En France, cette étude n'avait été faite que pour quelques régions, et à un moment où les techniques d'identification et de classification n'étaient pas assez précises pour que les organismes trouvés soient parfaitement déterminés. Néanmoins ces

travaux ont été entrepris dans le même but que celui que nous avons poursuivi, c'est pourquoi nous les avons particulièrement étudiés.

En 1904, DESCOFFRE (35) s'intéresse aux levures des Charentes, recueillies sur toutes les parties de la vigne, au cours d'une année entière. Il étudie aussi la succession des levures au cours de la fermentation (Torulas, apiculées, elliptiques). Il reconnaît l'action des agents extérieurs sur les organismes : agitation, lumière, influence du gaz carbonique ; il signale la différence entre les bouquets produits par les diverses levures qu'il a isolées. A la suite de ces observations, il conseille d'employer pour le levurage, « la collection complète des levures charentaises, simplement débarrassées des bactéries et des mycodermes ».

Beaucoup plus tard, en 1941, paraît la thèse de Jean RENAUD, élève de GUILLIERMOND, sur les levures des vins du Val de Loire (86). Dans la première partie de ce travail il décrit les méthodes de prélèvement, d'isolement et d'identification, puis les levures qu'il a isolées. Toutefois il n'y reconnaît pas plus de trois types simplement classés d'après la forme des cellules (cerevisiae, ellipsoïdeus, pastorianus) et ne peut donner le nom des espèces qu'il a obtenues, qui sont sans doute *Saccharomyces ellipsoïdeus* et *Saccharomyces oviformis*. Dans la deuxième partie, il étudie la biologie des levures de vin, surtout la sporulation et les phénomènes de sexualité des levures, mais il développe beaucoup moins leurs caractères biochimiques et leur rôle en vinification. RENAUD croit aussi à l'inutilité du levurage pour les vins de crus dont toute modification de bouquet est une perte de qualité. Ces travaux, d'inspiration un peu ancienne, sont repris dans une « Biologie du Vin » (87).

On peut encore citer quelques travaux moins importants : CORDIER (34) en 1906 fait quelques observations sur les levures de vins blancs qu'il trouve beaucoup plus nombreuses dans le midi de la France que dans le nord ou dans les régions parisienne et champenoise. MARTINAND (67) avait mesuré le nombre et la répartition des levures elliptiques et apiculées, mycodermes et moisissures trouvés sur les raisins au début et à la fin des vendanges : les levures elliptiques sont rares, parfois moins de 1 p. 100 du total des germes. BIDAN et ANDRÉ (7) ont fait une étude récente des vins jaunes du Jura : leur vinification très spéciale tient à la microflore constituée de *Saccharomyces, d'Hansenula*, de *Candida mycoderma*, levures oxydatives formant des voiles.

Signalons encore un récent travail de GALZY et RIOUX (44) sur les espèces de levures se développant en surface des vins du Midi au cours de leur conservation. D'autre part GALZY a donné une intéressante mise au point sur la position des levures de vin dans la systématique (43).

Travaux sur les levures d'Afrique du Nord.

Il existe aussi des travaux sur les levures d'Afrique du Nord réalisés en Algérie par Musso dans sa thèse en 1914 (74) et en Tunisie par Beraud en 1937 (5). Le premier a isolé après plusieurs sélections un petit nombre de levures. Il n'a retenu que celles qui lui paraissaient les plus intéressantes après des tests appropriés. Ce travail a un but pratique, nouveau par rapport aux recherches menées jusque-là : Musso soumet les levures isolées à des essais de fermentation à 35° et 38°, très justifiés en Algérie, et en présence de quantités croissantes d'acidité. Il étudie leur résistance à l'alcool et détermine les produits de la fermentation. Il en déduit divers rapports qui lui servent à caractériser les levures isolées. Il étudie la nature de l'acidité volatile formée, la nature des sucres susceptibles d'être fermentés, l'aspect des colonies géantes, la sporulation, puis il les classe d'après la clé de Guilliermond. Il conclut que les levures algériennes ont une résistance et une activité beaucoup plus grandes que celles des régions moins chaudes.

Beraud a isolé de lies de vin et de raisins au moment des vendanges en Tunisie, des levures elliptiques. Il a retenu les plus actives et a comparé leurs courbes de fermentation, et l'acidité qu'elles produisent sur l'eau de malt saccharosée.

Travaux sur les levures étrangères.

Divers travaux semblables ont été conduits en divers pays. C'est ainsi que Nitescu dans une thèse soutenue à Paris en 1914 (77) rend compte de ses recherches sur les levures roumaines : après une importante bibliographie, il décrit ses méthodes de prélèvement, d'isolement et d'identification par examens morphologiques et culturaux et par tests physiologiques : sucres fermentés, liquéfaction de la gélatine, influence de l'acidité et de l'alcalinité sur la marche de la fermentation, consommation du sucre, bilan de la fermentation, etc. Il a trouvé ainsi 11 variétés de levures elliptiques.

En 1939, Zimmermann (128) a publié une étude sur l'identification des ferments trouvés en Allemagne dans les vins malades ou troubles ; trois espèces de *Saccharomyces* sont représentées, *Sacch. cerevisiae*, *Sacch. carlsbergensis* variété *valdensis*, *Sacch. uvarum*. L'auteur cherchait surtout à élaborer des méthodes pour la détermination des variétés nouvelles.

En 1950, Krimbas et Davides (55) étudient la microflore des principaux cépages de cuves helléniques avec un but pratique : en plus des caractères morphologiques et physiologiques courants, ils recherchent les aptitudes particulières des levures isolées : fermentation des divers

sucres, assimilation des matières azotées, production d'alcool, résistance à l'alcool et à l'anhydride sulfureux. De plus ces auteurs ont conduit au laboratoire des fermentations expérimentales sur les divers cépages avec des volumes assez importants pour comparer leurs résultats avec ceux de la pratique courante, mais la microflore qu'ils ont isolée paraît assez spéciale, car sur 147 microorganismes ils ne décrivent que 15 *Saccharomyces*.

En 1950 également, Soos et Asvany (104) ont fait des recherches sur les levures hongroises. Le travail est important puisqu'ils ont isolé 1291 souches de levures qui ont donné 75 cultures pures. Ce sont surtout des *Sacch. ellipsoïdeus*, quelques *Sacch. oviformis* et un certain nombre de levures non identifiées. Mais de nombreux tests pratiques ont été effectués : fermentation des sucres, tolérance au sucre, résistance au froid, à la chaleur, production du bouquet.

La thèse de Steinberg (loc. cit. 106) sur les levures de vins « flétris » du domaine de Diolly constitue un travail du même genre. Ces vins sont obtenus par une pratique spéciale, la cueillette des raisins étant beaucoup plus tardive que dans les autres régions de Suisse. Les microorganismes sont différents : Steinberg a trouvé des *Saccharomyces*, des *Torulopsis*, *des Pichia*, et des *Hansenula*. Après l'exposé de ses méthodes, il propose pour ces levures un nouveau système de clés analytiques.

Sans aborder les nombreuses études des levures du type Xérès on relève, parmi les travaux de langue anglaise, celui de Mrak et Mac Clung en 1940 (71) sur les levures trouvées en Californie sur les produits de la vigne : raisins frais, marc, feuilles, sols, moûts et vins nouveaux, vins troubles en bouteilles. Ces auteurs ont isolé 241 espèces, dont 128 sur les raisins frais se répartissant en 134 *Saccharomyces*, 11 *Hanseniaspora*, 8 *Pichia*, 1 *Debaryomyces*, 6 *Rhodotorula*, 54 *Candida*, 1 *Lipomyces*.

En 1951, paraît le travail de Scheffer et Mrak (99) sur les levures provoquant des troubles dans des vins blancs secs. Sur les 18 échantillons de vins de Californie en leur possession, ils reconnaissent 14 espèces : 11 *Saccharomyces*, 2 *Pichia*, 1 *Candida*. De plus, ils les soumettent à une série de tests d'importance pratique en œnologie : développement sur le vin, température optimum, tolérance à l'alcool, tolérance à l'anhydride sulfureux, production d'alcool, production d'acidité totale et volatile. Ce travail comporte donc une orientation spéciale vers l'intérêt pratique.

Au cours de travaux qui ont porté sur un grand nombre d'échantillons prélevés dans la région vinicole la plus étendue et la plus renommée du Japon, I. Yokotsuka et ses collaborateurs (126) ont isolé de vins et de moûts en fermentation un très grand nombre d'espèces de levures, dont la répartition et la fréquence, en particulier pour les *Saccharomyces*, sont assez semblables à ce qu'on observe en Europe. Ils ont identifié *Sacch. ellipsoïdeus*, *Sacch. oviformis*, *Sacch. bayanus*, *Sacch. heterogenicus*,

Sacch. acidifaciens, Sacch. steineri, Sacch. fermentati, Sacch. rouxii, Torulaspora rosei, etc. Ces travaux, de même que ceux conduits en Californie, montrent qu'on retrouve dans le monde entier, dans la fermentation vinaire, à peu près le même équilibre écologique entre les espèces de *Saccharomyces*. Ces mêmes auteurs ont étudié les levures produisant des voiles sur les vins japonais (127).

Travaux sur les levures italiennes.

Il faut citer à part les travaux conduits dans les diverses universités et stations viticoles d'Italie. Ces études forment un ensemble de recherches systématiques, conduites région par région dans l'Italie entière : de Pavie, de Pérouse, de Pise, de Milan, de Turin, de Naples, des équipes de chercheurs sont parties pour prospecter la péninsule italienne, la Sicile et la Sardaigne.

Tous ces travaux fournissent une documentation très complète et certainement unique sur l'action des facteurs climatiques sur la microflore levurienne des raisins. A cause de sa forme étirée entre le 37^{e} et le 47^{e} parallèles, l'Italie permet d'apprécier l'influence de la latitude, traduite par le climat. A cause de son relief comportant une chaîne côtière, qui étage la culture de la vigne entre le niveau de la mer et une altitude de 700 mètres, les microclimats échelonnés en latitude sont reproduits en hauteur.

Ces études ont été commencées en 1933 par de Rossi dans la région de l'Ombrie (92) où 87 moûts ont donné 379 cultures pures dont 164 *Sacch. ellipsoïdeus*, 142 *K. apiculata*, 32 *K. magna*, 21 *Torulaspora rosei*.

En 1935, Casale et Mensio (15) étudient les ferments des régions septentrionales de l'Italie ; ils y trouvent la prédominance des levures apiculées en début de fermentation, puis peu à peu, les levures elliptiques prennent possession du milieu.

A partir de 1939, Castelli et ses collaborateurs commencent à prospecter les diverses régions d'Italie : Chianti et zone limitrophe en 1939 (16), les Pouilles en 1948 (20), la Calabre avec Capriotti, en 1952 (12), la province de Trévise par Capriotti et Cantarelli en 1952 (14), la Sicile occidentale en 1950 (24), et en 1953 avec Del Giudice (31), la Vénétie en 1953 avec Capriotti (13), la région de l'Etna en 1955 par Castelli et Del Giudice (32).

En même temps, Verona et ses collaborateurs étudiaient d'autres régions : en 1949, la Toscane (38), en 1951 la Sardaigne (115). D'autre part, Malan, en 1951 prospectait le Piémont (64).

Les travaux des chercheurs italiens précisent le nombre de souches obtenues, la répartition des différentes espèces, la fréquence de ces espèces

dans les moûts prélevés, les propriétés morphologiques et physiologiques de ces levures.

Les espèces les plus courantes sont *K. apiculata* et *Sacch. ellipsoïdeus* : on les trouve dans presque tous les moûts. Ce sont elles qui sont en général responsables de la fermentation vinaire. Un second groupe d'espèces est formé par *Sacch. bayanus, uvarum, italicus, mangini*, par *Torulaspora rosei, Candida pulcherrima* et *K. magna*. Ces espèces plus rares, ne sont pas représentées dans tous les moûts, mais sont cependant assez courantes pour que l'on puisse croire à leur participation effective à la fermentation. Enfin, un troisième groupe est formé de levures dont la présence est accidentelle.

De ces travaux, résumés à plusieurs reprises par CASTELLI en 1948 (21), en 1952 (26, 27) et en 1954 (29, 30), il résulte que le climat a une influence déterminante sur la répartition des espèces ; elle subit des variations importantes du nord au sud de l'Italie. Dans les régions septentrionales, les espèces sont en majorité asporogènes, les *K. apiculata* sont très nombreuses, plus que les Saccharomyces. Dans l'Italie centrale les proportions sont à peu près égales. Mais dans les régions méridionales ce sont les espèces sporogènes qui dominent et les *K. apiculata* sont peu à peu remplacées par les *Hanseniaspora*, levures apiculées formant des spores.

D'une façon générale, les degrés alcooliques obtenus sont plus élevés au sud que dans le nord, et ceci est vrai à la fois pour les levures apiculées et pour les levures elliptiques. Les chercheurs italiens présentent des graphiques très significatifs à ce sujet.

Ces volumineux travaux amènent à penser qu'il y a une adaptation de la microflore levurienne au climat, et en particulier à la température : en effet dans les régions où une chaîne de montagnes longe la côte, on retrouve à une altitude plus élevée les mêmes caractères dans la répartition des espèces que dans des régions de plaine situées plus au nord. La richesse des moûts en sucre, plus forte dans les régions chaudes, participe certainement à l'adaptation.

D'autre part, les propriétés physiologiques des différentes levures isolées ont montré aux chercheurs italiens que l'homme peut intervenir parfois avec intérêt dans le choix des organismes de fermentation. *T. rosei*, par exemple, doué d'un pouvoir alcoogène moyen, produit une très faible acidité volatile et a été utilisé dans certaines caves italiennes de vins de consommation courante (11). La résistance à l'anhydride sulfureux a aussi conduit les auteurs italiens à la recherche de races adaptées à des taux élevés de cet antiseptique, mais ce caractère ne semble pas acquis définitivement (113). SCARDOVI (97) s'intéresse aussi à ce problème et à celui de l'hybridation en vue d'améliorer par voie génétique les qualités industrielles des levures. J. ROSSI (93) étudie la floculation de 63

levures de vin, qualité recherchée pour obtenir la clarification spontanée des vins.

Ces travaux forment un ensemble du plus haut intérêt par l'abondante documentation qu'ils fournissent sur un pays où la culture de la vigne est très répandue et dont une partie est à la même latitude que le nôtre ; on peut affirmer qu'ils ont fait école dans le monde.

Travaux sur diverses espèces.

Les travaux d'écologie sur la répartition des levures dans la nature, en particulier sur les fleurs et les fruits, sont très nombreux et nous n'en ferons pas état, bien qu'ils puissent donner souvent des résultats analogues à ceux obtenus pour la vigne et le raisin. Nous avons déjà cité la monographie de LUND à ce sujet.

Il n'est pas dans notre intention non plus d'entrer dans le détail du nombre considérable de travaux consacrés aux caractères cytologiques, génétiques, physiologiques, enzymatiques, auxologiques des levures et aux divers aspects de leur métabolisme. Nous citerons cependant les études de Suzanne LAFOURCADE (57) et de Madeleine LAFON (56) qui constituent les deux volets du triptyque consacré à l'étude des levures de vin par le service de recherches de la Station œnologique de Bordeaux.

Un certain nombre d'auteurs se sont attachés à l'étude d'une espèce particulière de levures. Parmi ces travaux nous citerons ceux présentant un intérêt pour la connaissance des levures de vin.

Les levures apiculées ont été le sujet des recherches de HANSEN à partir de 1881 ; de JORGENSEN en 1900 (52), de DE ROSSI en 1920 (91), de NIEHAUS en 1932 (76), de TARANTOLA en 1933 et 1945 (109, 110), d'ANTONIANI en 1947 (2), de VERONA en 1951 (116) de VAN UDEN et ASSIS-LOPEZ en 1953 (111).

Les opinions sur l'utilité des *K. apiculata* sont diverses. Apparemment leur participation n'est pas intéressante, car elles donnent peu d'alcool et forment beaucoup d'acidité volatile. Les *K. apiculata* forment des produits secondaires qui ont une influence certaine sur le bouquet, mais cette influence n'est pas stable et TARANTOLA conseille d'éliminer cette espèce dans la fermentation vinaire par l'anhydride sulfureux. On admet généralement que les levures apiculées n'agissent qu'au début de la fermentation, étant vite paralysées par l'alcool, néanmoins VERONA pense qu'elles peuvent intervenir jusqu'à la fin de la fermentation.

L'espèce *Brettanomyces* a donné lieu à plusieurs travaux. Elle a été découverte tout d'abord dans les bières, par CLAUSSEN en 1904, mais KUFFERATH et VAN LAER ont été les premiers à en faire un nouveau genre. VERONA et FLORENZANO (119) l'ont signalée sur les raisins, mais

il s'agissait en réalité de *T. bacillaris*. SCHANDERL et DRACZYNSKI (98) l'ont trouvée dans des vins mousseux allemands et BARRET, BIDAN et ANDRÉ (4) l'ont isolée sur des vins d'Arbois, dans lesquels elle produit des troubles gênants. De même GALZY et RIOUX (44) ont trouvé *Brettanomyces bruxellensis* associé avec la maladie de la « fleur » sur des vins du Midi. Cependant certains auteurs ne croient pas à sa présence sur le raisin et sont persuadés même que ce genre n'est pas valable.

VAN DER WALT (122) a étudié *Candida pulcherrima*, avec son cycle de vie, l'apparition de mutants rouges. VERONA et FLORENZANO lui ont consacré également une publication (121).

Le genre *Hansenula* a été étudié par GRAY en 1949 (48) qui a recherché les conditions de formation de l'acétate d'éthyle et par CANTARELLI, en 1950 (10), qui a comparé trois variétés d'*Hansenula anomala*. Signalons encore les travaux de TABACHNICK et JOSLYN (108).

Enfin, HJORT en 1954 (50) a fait quelques études sur le genre *Saccharomycodes* Hansen.

En résumé, la bibliographie concernant les levures de vin est très abondante, mais nous avons pu constater combien la contribution des œnologues français à cette étude reste faible. Cela est particulièrement visible si on la compare avec les recherches menées en Italie depuis déjà un certain nombre d'années. C'est la raison pour laquelle nous avons entrepris cette étude, en espérant qu'elle contribuera à combler cette lacune.

CHAPITRE II

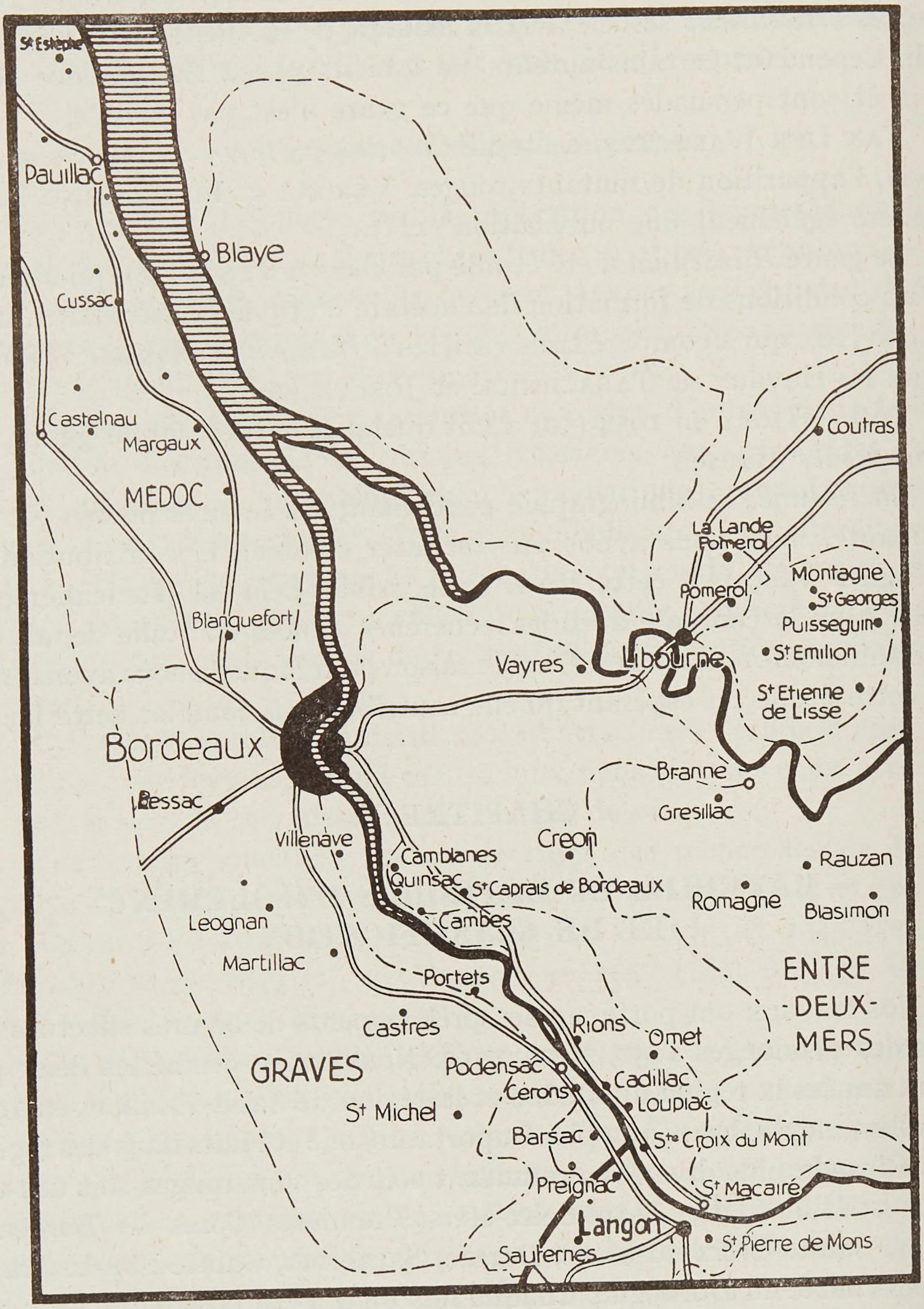
MATÉRIEL ET MÉTHODES D'ISOLEMENT ET DE CLASSIFICATION

Nos travaux ont porté sur les prélèvements de levures effectués aux cours des vendanges 1951, 1952, 1953. Nous avons étudié les deux premières années la région du Médoc et la région de Saint-Emilion ; en 1953, les prélèvements, beaucoup plus importants, ont été faits dans des régions de la Gironde plus diverses, produisant soit des vins rouges, soit des vins blancs : Libournais, Entre-deux-Mers, Premières Côtes de Bordeaux, Graves, Sainte-Croix-du-Mont, Barsac, Sauternes, Sainte-Foy-la-Grande et Monbazillac en Dordogne. Chaque fois qu'il a été possible, nous avons fait des prélèvements deux années de suite dans la même région, ou dans la même propriété, afin de vérifier si la microflore était constante. La carte reproduite dans ce travail, indique les régions prospectées à l'exception de Sainte-Foy-la Grande et Monbazillac situé en Dordogne.

Enfin, nous avons pu étudier un certain nombre de vins blancs et rouges subissant, au cours de leur conservation, une refermentation soit

en fûts, soit en bouteilles. Il provenaient de chais de producteurs ou de négociants.

Pour le prélèvement des échantillons au moment des vendanges,



nous nous sommes inspirés des travaux italiens qui ont comporté une étude systématique de chaque région d'Italie.

Pour l'étude des levures, nous avons suivi les méthodes employées par Stelling-Dekker et Lodder. La parution de l'ouvrage de Lodder et K-Van Rij en 1952 (61) nous a été d'un grand secours et c'est en nous basant sur les classifications et les descriptions qu'il propose que nous

avons pu identifier les organismes isolés. Nous avons eu également recours, dans les cas difficiles, aux avis autorisés du Prof. Castelli de Pérouse et de Mlle Sloof de Delft, et nous tenons à les en remercier très vivement.

I. — TECHNIQUE DES PRÉLÈVEMENTS

En 1951, nous avons prélevé avec des ciseaux stérilisés, environ 1 kg de grappes de raisins sains, dans chaque propriété étudiée, au centre des pièces de vignes, à l'écart des chemins ; nous les avons recueillis dans des poches de toile, enveloppées de feuilles de papier filtre et stérilisées en autoclave. Le lendemain de la récolte, au laboratoire, les raisins étaient pressés entre les mains lavées au préalable à l'alcool, à travers la poche de toile, dans un mortier de porcelaine lavé à l'alcool et flambé. On recueillait ainsi 500 à 600 cm^3 de jus qui était mis à fermenter à 25°C en bouteilles de 750 cm^3 stérilisées.

Ce système de prélèvement nous donnait surtout des levures apiculées et conduisait à une répartition des levures fort différente de celle des levures de fermentation dans la pratique. Nous avons donc modifié par la suite la technique de nos prélèvements.

Nous avons alors recueilli du moût non sulfité des cuves récemment chargées, ou de la vendange simplement foulée et égrappée. Parfois nos prélèvements portèrent sur du moût déjà en fermentation. Ce liquide était recueilli dans des bouteilles stériles de 750 cm^3.

Le jour même ou, au plus tard le lendemain, nous commencions au laboratoire les opérations en vue de l'isolement des espèces contenues dans ces liquides.

II. — TECHNIQUE DES ISOLEMENTS

Le liquide obtenu par le pressurage des raisins à la main ou le moût recueilli à la propriété, était homogénéisé. A l'aide d'une anse de platine flambée, on ensemençait un tube contenant 10 cm^3 de moût de raisin stérile. Après agitation par rotation entre les paumes des deux mains, ce tube servait à une nouvelle dilution effectuée de la même façon dans un deuxième tube qui servait lui-même pour un troisième. Le contenu de ces trois tubes, versé dans trois boîtes de Pétri stérilisées et mélangé avec de la gélatine à 20 p. 100 fondue fournissait trois dilutions successives des organismes présents dans le jus de raisins.

Au bout de quelques jours de conservation des boîtes de Pétri à la température du laboratoire, des colonies apparaissent à la surface de la gélatine nutritive ou en profondeur. Avec un fil de platine flambé, on prélevait successivement un certain nombre de colonies, six en général,

et les introduisait chacune dans un tube de moût stérile. On notait les caractères de la colonie choisie : en relief, en creux, brillante, mate, prise à la surface ou en profondeur, liquéfiant ou ne liquéfiant pas la gélatine.

Par ailleurs, les flacons de 750 cm^3 avaient été mis à fermenter à l'étuve à 25°C et des prélèvements semblables étaient faits plusieurs fois, à divers intervalles de temps, suivis d'isolement en milieu solide, selon la même méthode.

Un dernier prélèvement fut fait bien après la fin de la fermentation (au bout de deux mois). L'ensemencement direct des boîtes de Pétri n'étant pas possible dans ces conditions, une culture de rajeunissement fut d'abord préparée. Seule la deuxième dilution fut utilisable, car le nombre de colonies était beaucoup plus élevé qu'au premier prélèvement.

En 1952, les isolements ont été conduits plus rationnellement dès le début : les boîtes de Pétri ont été ensemencées le jour même du pressurage à la main des raisins, puis le dixième jour et le trentième jour, avec deux dilutions seulement. De plus, dans la plupart des propriétés un prélèvement à la cuve ayant été fait en même temps, il servit à préparer une autre boîte de Pétri avec la deuxième dilution de ce liquide, le lendemain du prélèvement. Dans chaque boîte de Pétri, 6 colonies ont été choisies.

En 1953, il n'a été prélevé que des liquides, soit dans les cuves pour les raisins rouges, soit à la sortie des presses pour les raisins blancs, soit dans les fûts de fermentation, en particulier à Sauternes. Afin de différencier au maximum les espèces présentes dans ces jus tout prêts à fermenter, nous avons partagé les 600 cm^3 de liquide recueilli entre quatre flacons stériles ; l'un d'eux, servant de témoin, n'a reçu aucune addition tandis que les trois autres ont reçu respectivement 6,5 cm^3 d'alcool à 95° ,ce qui portait le milieu à 4° d'alcool, 10 mg/l d'actidione et enfin 4° d'alcool + 10 mg/l d'actidione. De cette façon, nous avons éliminé la plupart des Saccharomyces par addition d'actidione. Nous avons pensé obtenir ainsi des espèces plus rares.

Trois prélèvements, avec deux dilutions et ensemencements en boîtes de Pétri, ont été faits sur les témoins le premier jour, le vingtième jour et au bout de deux mois après rajeunissement sur moût stérile. Les flacons qui avaient subi les additions ont été tenus à l'étuve à 25° ; mais l'actidione et le mélange alcool et actidione ayant empêché le départ de la fermentation par les levures les plus actives, les bactéries ont envahi les milieux correspondants et il a été souvent impossible d'isoler les levures. Les prélèvements ont été faits le plus tôt possible soit 2 à 8 jours après l'addition, et l'ensemencement des boîtes de Pétri a été fait à deux dilutions, mais à un seul moment pour chaque flacon.

Les différences dans le nombre des colonies observées dans les boîtes de Pétri ont attiré notre attention sur la prolifération des levures aux di-

vers moments de la vendange. Par dilutions exactes, et numération en milieu solide, nous avons pu connaître le nombre de levures contenues par mm^3 de jus de raisins cueillis ou prélevés en divers endroits des propriétés. Le détail des résultats a été donné dans une publication précédente (79). En moyenne, on compte 35 levures par mm^3 de jus pour des raisins prélevés aseptiquement à la vigne, 44 levures pour des raisins prélevés à la comporte à leur arrivée au cuvier, et plus de 1 800 levures à la sortie du fouloir-égrappoir.

De ces chiffres il ressort que, même en période de vendanges, il y a relativement peu de levures sur les raisins et qu'elles sont très irrégulièrement réparties. Ainsi s'explique la lenteur des départs en fermentation au laboratoire lorsqu'on prélève aseptiquement des raisins à la vigne. Dès que la vendange est un peu manipulée, ce qui aboutit à l'écrasement des grains de raisins mûrs, les levures deviennent plus nombreuses car le jus qui se répand sert à la fois d'aliment et de véhicule aux levures qui envahissent tout le matériel des vendanges. La fermentation étant conduite par les levures les plus nombreuses, il y a intérêt à faire les prélèvements non pas sur les raisins, mais sur les moûts obtenus après le foulage. C'est ce que nous avons fait en 1952 et 1953.

Il faut reconnaître cependant que les souches isolées ne représentent qu'une minime partie des souches existantes dans le moût : alors qu'il y a plus d'un million de cellules de levures par cm^3 du jus provenant du foulage, nous n'avons pu retenir et étudier que 30 souches au maximum pour chacun d'eux. On n'obtient ainsi que les espèces prédominantes. Pour cette raison, même les levures qui paraissent rares d'après nos chiffres, peuvent avoir une action non négligeable au cours de la fermentation. Il est certain que d'autres espèces existent, qu'au cours de nos essais nous n'avons pas rencontrées. Néanmoins, nous pensons que les prélèvements effectués donnent une idée valable de la microflore qui conduit la fermentation dans la région bordelaise.

III — ÉTUDES DES LEVURES ISOLÉES

La différienciation et la classification des levures sont surtout basées sur leurs caractères morphologiques et physiologiques. Ces caractères n'ont pas tous la même importance dans la classification ; certains en effet se montrent trop variables suivant les conditions extérieures pour que l'on puisse établir d'après eux un diagnostic certain.

Nous avons utilisé divers milieux de culture au cours de cette étude, ils seront décrits plus loin avec la méthode employée pour le test correspondant. Nous décrirons ici les milieux de culture liquides et solides qui nous ont servi couramment.

a) **Milieu de culture et de conservation.** — C'est du moût de raisin pasteurisé. Suivant les années il n'a pas toujours eu la même composition. La teneur en sucre a varié de 150 à 227 g/l. Le moût pasteurisé est filtré puis réparti, à raison de 10 cm³ par tube, en tubes bouchés d'un tampon d'ouate, stérilisés une heure à 180 °. Les tubes pleins sont stérilisés à l'autoclave en les portant à 120°. Ce milieu étant naturellement acide, il n'y a pas avantage à le chauffer plus longtemps car il perd ses facteurs de croissance et le chauffage oxyde les sucres.

b) **Milieux solides de conservation** — *Malt gélosé* — Nous employons du moût de bière naturel, pasteurisé, dilué à 15° Balling (d = 1,059), neutralisé à pH 7.

On y dissout à 100° la gélose finement coupée à raison de 15 g par litre. On répartit en tubes stériles, stérilise 15 minutes à 120° et laisse refroidir les tubes en position inclinée.

Eau de carotte gélosée — On fait macérer 450 g de carottes rapées dans 3,6 l d'eau, pendant une heure. Après 10 minutes d'ébullition, on filtre sur coton. On ramène le pH à 5 et on solidifie le milieu par 30 g de gélose par litre dissoute comme précédemment ; on répartit en tubes stériles qui après stérilisation pendant 15 minutes à 120° sont mis à refroidir en position inclinée. Sur ce milieu, préconisé par MALAN (64), les *Saccharomyces* sporulent très bien et se conservent longtemps.

c) **Température de conservation** — Nous conservons à basse température les cultures de levures non sporogènes en milieu liquide ou en milieu solide. Nous les rajeunissons tous les quatre mois et après quelques jours de développement à 25°, nous les mettons au froid.

Les levures sporogènes sont repiquées tous les deux mois et conservées en milieu liquide et en milieu solide à la température du laboratoire. Pour les *Saccharomyces* le milieu solide choisi est l'eau de carotte gélosée, pour toutes les autres levures, c'est le malt gélosé.

Pour atténuer les variations possibles au cours de la conservation, les repiquages se font à partir de la culture précédente de milieu liquide à milieu solide et inversement.

Les tubes de milieu solide sont capuchonnés de papier filtre afin d'éviter la pénétration des germes de moisissures à travers le tampon d'ouate.

A. — Examen des caractères morphologiques.

Forme et dimensions des cellules — Le milieu liquide choisi est le moût de raisin stérile. Les observations au microscope ont été faites au bout de trois jours, ou de six jours de culture à 25°, avec un grossissement de 900.

Cet examen permet de différencier rapidement les levures apiculées, les *Saccharomycodes*, les *Torulopsis bacillaris*, les espèces rondes ou allongées. Nous avons noté les dimensions des cellules et nous les avons dessinées. Le mode de bourgeonnement a ainsi été noté : polaire, bipolaire, multipolaire.

Cet examen est très important lorsqu'il permet de distinguer des genres. Mais il devient à notre sens beaucoup plus délicat quand il s'agit d'espèces, ce qui est le cas dans la distinction entre *Sacch. exiguus* et *Sacch. chevalieri*, entre *Sacch. fermentati*, *Sacch. oviformis* et *Sacch. bayanus*, et même dans un autre groupe entre *Sacch. florentinus*, *Sacch. carlsbergensis* et *Sacch. uvarum*.

Les descriptions ne suffisent d'ailleurs pas, du fait du manque de précision des termes « ovale », « elliptique », « allongé ». Le nombre de générations successives de levures dans une préparation met en présence des cellules de toutes dimensions que l'on peut retrouver dans toutes les espèces.

Formation des spores — Ce caractère est d'une importance fondamentale puisqu'il permet de placer l'organisme considéré soit parmi les levures sporogènes ou *Saccharomycetaceae*, soit parmi les levures non sporogènes ou *Fungi imperfecti* qui sont les deux grands groupes des champignons.

Mais ce caractère est parfois difficile à mettre en évidence, car il est courant que certaines espèces de *Saccharomycetaceae* perdent leur faculté de sporulation au cours d'une longue conservation.

De plus cette propriété dépend beaucoup des conditions extérieures. La composition du milieu a une grande importance ; il y aurait intérêt à connaître la composition exacte d'un milieu standard pour sporulation. Mais actuellement il existe une grande quantité de milieux proposés pour cette étude, dont beaucoup ne conviennent qu'à une seule espèce.

Nous avons utilisé comme milieux de sporulation le malt gélosé des cultures de conservation, sur lesquelles apparaissent souvent des spores, l'eau de carotte gélosée, et enfin, le milieu classique de GORODKOWA [1], l'examen microscopique a été fait au bout d'un mois de culture à la température du laboratoire.

Caractères culturaux — *Caractères de la colonie prélevée sur la gélatine de la boîte de Pétri* : aspect, liquéfaction de la gélatine.

Caractères de la culture sur moût de raisin. — L'observation est faite au bout de trois à six jours et au bout de deux mois : elle porte sur la limpidité qui donne une idée de la faculté de sédimentation de la levure, importante en œnologie. Il peut y avoir formation d'un anneau ou d'un voile, propriété qui se rattache aux caractères physiologiques de la levure puisqu'il y a un rapport entre le besoin d'oxygène et la formation des voiles. Nous avons parfois noté l'aspect de la mousse.

(1) Milieu de GORODKOVA : glucose 0,1 p. 100 ; peptone 1 p. 100 ; NaCl 0,5 p. 100 ; gélose 3 p. 100.

Caractères de la culture sur malt gélosé. — Nous les avons observés au bout de quelques jours et au bout de deux mois de culture. On note la couleur, l'aspect brillant ou mat, lisse ou ridé, la bordure unie, festonnée, ramifiée, ou lobée.

Caractères de la colonie géante sur moût de raisin gélatiné. — Ce test ne peut être fait que pour les levures qui ne liquéfient pas la gélatine. On peut noter au bout de un ou deux mois : la couleur, la forme, l'espect mat ou brillant, le relief, l'épaisseur, l'aspect de la bordure de la colonie.

Toutefois, si certains genres se différencient bien de cette façon : *Torulopsis bacillaris,* il n'en est pas de même pour les diverses espèces de *Saccharomyces,* pour lesquelles on ne peut trouver aucun trait commun distinctif. Parmi les *Saccharomyces* d'une même espèce, on peut trouver toutes les variations et entre plusieurs espèces, observer toutes les transitions. Cependant, nous avons pu noter une certaine parenté entre les levures d'une même origine, résidant dans la coloration, la grosseur, ou la forme générale.

Mais si l'on refait le test on ne trouve pas obligatoirement des résultats identiques. Un grand nombre de facteurs doivent intervenir parmi lesquels la consistance de la gélatine est un des plus importants.

Dans certains cas, nous avons essayé d'obtenir des colonies géantes sur moût de raisin gélosé, et moût de bière gélosé, préparés de la même façon que le moût gélatiné. Les colonies sont tout-à-fait différentes : beaucoup plus épaisses, blanches, informes, que sur moût de raisin gélatiné.

Tous ces caractères ne nous paraissent pas assez fidèles pour avoir une réelle importance dans l'identification et la classification des levures. Ce sont des caractères secondaires pouvant confirmer d'autres résultats plus décisifs. D'ailleurs les termes de description sont subjectifs et trop imprécis, pour qu'on puisse établir une classification uniquement d'après la description des caractères culturaux.

B. — Examen des caractères physiologiques.

Fermentation des différents sucres. — La propriété de faire fermenter divers hydrates de carbone dépend de la richesse enzymatique de la cellule de levure. C'est donc un caractère particulièrement stable, qui est à la base des études d'identification et de classification des levures. Il a été employé par tous les chercheurs.

Nous avons utilisé les tubes de DURHAM que beaucoup d'auteurs (8,61) trouvent plus sensibles que les tubes d'EINHORN. Nos essais de fermentation ont porté sur le maltose, le saccharose, le galactose et le raffinose, et dans quelques cas particuliers seulement, sur le lactose.

Nous avons jugé inutile d'essayer le glucose et le lévulose puisque les cultures ont été faites sur moût de raisin qui contient des quantités

à peu près égales de ces deux oses et que nous n'avons retenu que les levures fermentatives. D'ailleurs KLUYVER a énoncé la règle qu'une levure qui fait fermenter le glucose, fait fermenter aussi le fructose et le mannose.

Pour la constitution du milieu, nous avons employé de l'eau de levure, ou de l'extrait de levure, dans lesquels BOUTHILET et ses collaborateurs (8) ont mis en évidence la présence de tréhalose, sucre fermentescible. LODDER et K-VAN RIJ qui emploient ce même milieu, considèrent que le tréhalose ne modifie pas les résultats du test. Nous avons toujours préparé les milieux par grandes quantités, il y a toujours eu des levures qui ne faisaient pas fermenter tel ou tel sucre, ce qui prouve que la présence possible de tréhalose n'a pas fait paraître positifs des résultats négatifs.

Le raffinose est un triholoside formé d'un ose, le fructose, et d'un diholoside, le mélibiose formé lui-même de glucose et de galactose. Certaines levures ne font pas fermenter le raffinose, d'autres capables de l'hydrolyser, le font fermenter. On distingue celles qui ne le font fermenter que partiellement : ce sont celles qui détachent le fructose, soit un tiers de la molécule, mais qui sont sans action sur le mélibiose et celles qui hydrolysent à son tour le mélibiose, mais laissent intact le galactose. Enfin, certaines levures, capables de faire fermenter le galactose, poussent jusqu'au bout la transformation. Or on ne peut dire a priori, en se basant sur le seul dégagement gazeux de quelle manière la levure a dégradé le raffinose.

Divers moyens ont été proposés. LODDER et KREGER-VAN RIJ utilisent l'appareil de VAN ITERSON-KLUYVER, quand la levure est capable de faire fermenter le saccharose. On peut employer également les méthodes biologiques de WICKERHAM (124) ou de SKINNER et BOUTHILET (103). Le premier, quand le dégagement gazeux produit par la fermentation du raffinose a cessé, ensemence le tube avec *Sacch. carlsbergensis* : si un nouveau dégagement gazeux se produit, signe de la présence de mélibiose, la levure essayée n'avait donc fait fermenter qu'un tiers du raffinose. Si au contraire il n'y a pas de dégagement de CO_2 après l'ensemencement de *Sacch. carlsbergensis* la levure avait fait fermenter le raffinose entièrement.

SKINNER et BOUTHILET opèrent à l'inverse : ils font fermenter une solution de raffinose par *Sacch. ellipsoïdeus* qui y laisse le mélibiose inattaqué. Ils ensemencent cette solution de mélibiose avec la levure essayée. Cela revient à ajouter le mélibiose à la liste des sucres mis à l'essai.

Nous avons employé un autre moyen qui nous a donné de bons résultats ; lorsque le dégagement gazeux visible dans le petit tube de DURHAM prouve qu'il y a eu fermentation, deux cas sont possibles : il reste dans le milieu le mélibiose, sucre réducteur, ou il ne reste plus aucun sucre. Si on essaie le pouvoir du résidu de la fermentation vis-à-vis de la liqueur de FEHLING, il est possible de savoir si le raffinose a été fermenté au tiers ou entièrement. Pour cela il faut attendre que la fermentation soit terminée : nous attendons un mois. Il faut 0,6 cm^3 du résidu de fermentation de

10 cm^3 d'eau de levure sucrée à 2 p. 100 de raffinose, pour faire disparaître la couleur bleue de 1 cm^3 de liqueur de FEHLING à 5 g/l, dans le cas des *Sacch. ellipsoïdeus* et de toutes les levures qui ne font fermenter que le tiers du raffinose.

Pour les autres (*Sacch. florentinus, Sacch. carlsbergensis, Sacch. uvarum*) tout le résidu de fermentation ne peut décolorer 1 cm^3 de liqueur de FEHLING et aucune trace de réduction n'est visible.

Le milieu de base utilisé dans les tests de fermentation a été d'abord de l'eau de levure (200 g de levure SPRINGER par litre), puis un extrait de levure préparé avec 7,5 g/l d'un extrait commercial.

On prépare d'autre part les solutions sucrées à 10 p. 100 du sucre considéré, dans l'eau du robinet. On stérilise en portant à 120°.

Le milieu définitif contient 4/5 d'extrait ou d'eau de levure et 1/5 de solution sucrée ce qui porte la solution définitive à 2 p. 100 en sucre. On répartit dans les tubes contenant une clochette DURHAM renversée stérilisés au préable. On stérilise à l'autoclave 10 minutes à 110° : l'air des clochettes ayant été chassé à l'ébullition, elles se remplissent de liquide au refroidissement.

On ensemence un tube de chaque sucre avec 2 gouttes d'une culture de 3 jours. On place à 25 °C. On vérifie tous les jours jusqu'au dixième l'apparition des bulles de gaz carbonique.

Assimilation des différents sucres — Tous les sucres fermentés par une levure sont aussi assimilés, mais la réciproque n'est pas vraie. Ce test s'applique aux sucres non fermentés, car certains peuvent subir à défaut d'une fermentation une assimilation oxydative.

LODDER (61) utilise la méthode auxanographique dans la pratique courante, réservant l'emploi des milieux liquides pour les cas difficiles. Nous avons préféré opérer toujours en milieu liquide avec un milieu entièrement synthétique.

Nous avons borné notre étude à celle des sucres non fermentés par la levure, mais WICKERHAM (123) et WICKERHAM et BURTON (124) ont beaucoup allongé la liste des substances susceptibles d'être essayées dans ce test.

Le milieu de base contient les sels minéraux nécessaires sous forme de cendres de levures. Nous employons de la levure de boulangerie que nous faisons sécher puis calciner. On dissout 6 g de cendres charbonneuses par litre d'eau distillée, avec 6 g d'acide citrique. On fait bouillir 20 minutes. On filtre, on ajoute 2 g de $SO_4(NH_4)_2$ et 3 g d'asparagine par litre puis les vitamines :

B_1	1 mg/l
B_6	1 mg/l
Acide paraaminobenzoïque	1 mg/l
Acide nicotinique	1 mg/l
Acide pantothénique	1 mg/l
Biotine	0,1 mg/l
Inositol	5 mg/l

On neutralise à pH 7 avec de la potasse. On ajoute le sucre considéré à raison de 5 g par litre. On répartit en tubes bien limpides et calibrés. La stérilisation doit être très rapide afin de ne pas détruire les facteurs de croissance : on porte la température à 110°, et ouvre l'autoclave dès qu'elle est descendue à 100°, on retire les tubes et les refroidit rapidement.

On ensemence avec 2 gouttes d'une culture de 3 jours, les tubes contenant les sucres non fermentés par la levure, plus un tube témoin avec glucose, plus un tube témoin sans aucun sucre, qui indiquent les limites du développement.

Au bout de 15 jours à 25°, on observe les résultats : on remet les dépôts en suspension et compare l'opacité des tubes. Dans certains cas, l'absorptiomètre permet de chiffrer des différences que l'œil ne perçoit pas.

Néanmoins, l'interprétation n'est pas toujours très nette, le dépôt est parfois important, même dans le milieu sans sucre.

Fermentation sélective du glucose et du fructose — Il est bien connu qu'en présence d'un mélange de glucose et de fructose, tel que le sucre inverti, les levures s'attaquent généralement d'abord au glucose, puis consomment le fructose : habituellement le sucre qui reste dans les vins blancs est surtout du fructose de sorte que le pouvoir rotatoire de ces vins est négatif. Cependant, GAYON et DUBOURG (45) ont découvert en 1890 des levures qui dans une solution de sucre inverti choisissent d'abord le fructose. DUBOURG trouve dans certains vins de Sauternes une levure qui fait fermenter le fructose plus rapidement que le glucose. Il n'identifie pas cette levure qui sera dès lors désignée comme « levure de Sauternes ».

Nous avons identifié une souche de cette levure, fournie par l'Institut Pasteur : il s'agit de *Sacch. elegans*.

Dans une récente publication (81) nous avons comparé 28 espèces de levures isolées de la région de Sauternes au sujet de la fermentation du glucose et du fructose. Les levures se classent en trois groupes. *Sacch. acidifaciens*, *Sacch. élegans*, *Sacch. rouxii* et *Torulopsis bacillaris* font fermenter plus vite le fructose que le glucose. Pour un autre groupe la fermentation des deux sucres est du même ordre de grandeur ; enfin la plupart des levures font fermenter le glucose plus vite que le fructose.

La constance de ces caractères rend ce test utilisable pour l'identification.

Courbes de fermentation — Pouvoir alcoogène — Il est défini par le degré alcoolique maximum obtenu par la levure considérée dans un moût riche en sucre. On utilise du moût de raisin enrichi à 18-19° lorsqu'il s'agit de *Saccharomyces* ; du moût naturel (12 à 14°) pour les levures moins alcoogènes, du moût dilué à 10° pour les levures apiculées.

Les essais sont effectués dans de petites bouteilles de 90 cm³ conte-

nant 60 cm³ du milieu choisi et qui ont été stérilisées rapidement à l'autoclave. On ensemence deux flacons avec 1 cm³ de culture de trois jours. L'un est bouché d'un tampon d'ouate, réalisant la fermentation en aérobiose, le goulot du second est obturé d'un bouchon de caoutchouc traversé par un tube effilé bourré d'ouate : il réalise la fermentation en anaérobiose. On laisse fermenter à l'étuve à 25° C.

Le premier, le troisième, le sixième, le douzième et le vingt-cinquième jours on pèse les flacons de la fermentation anaérobie. La perte de poids, due au départ du gaz carbonique, permet de tracer une courbe qui reflète l'allure de la fermentation. On peut comparer ces pertes de poids à celles d'un flacon témoin contenant le même milieu, bouché de la même façon, mais non ensemencé, représentant la perte de poids par évaporation. Cette dernière est faible, et généralement négligeable. Il n'en est pas de même avec les flacons bouchés simplement d'un tampon d'ouate. De même, on ne peut apprécier, à cause de l'évaporation, le degré alcoolique produit en aérobiose, que par le calcul à partir du sucre consommé (17,5 g de sucre donnent 1° d'alcool par convention). Au bout de 45 jours, on détermine le degré alcoolique par ébulliométrie dans les flacons bouchés d'un tube effilé, l'acidité volatile produite et le sucre restant.

Ces résultats permettent de connaître l'activité fermentative de la levure, son importance et sa valeur dans la vinification.

Influence de divers facteurs sur le pouvoir alcoogène des levures. — Avec une même levure expérimentée en plusieurs exemplaires sur le même milieu préparé de la même façon, on observe de notables différences, s'élevant jusqu'à 1°8 d'alcool dans le pouvoir alcoogène de la levure. Nous avons donc cherché quels pouvaient être les facteurs influant sur cette propriété.

Le chauffage du moût au cours de la stérilisation, nous semblait avoir une importance. Des essais ont été conduits sur des moûts soumis à des températures et à des temps de chauffage différents. On a comparé le moût chauffé, à 100° pendant 15 minutes, à 120° pendant 15 minutes et à 120° pendant 60 minutes.

Le chauffage à 120°, même prolongé peu de temps, diminue la fermentescibilité, les degrés obtenus sont plus faibles ; de plus, l'acidité volatile formée est plus élevée. La même action s'observe dans les deux conditions d'aération. Par contre le chauffage à 100° ne paraît pas avoir d'influence appréciable.

Le vieillissement du milieu de culture abandonné pendant un mois à la température ordinaire, en flacons incomplètement pleins, bouchés d'ouate et capuchonnés de papier filtre, ne semble pas non plus avoir d'influence marquée sur la fermentescibilité et d'autre part la conservation du moût en glacière ne présente pas d'avantage.

Afin de voir l'influence de l'âge du levain, on a ensemencé les flacons avec des cultures de la même levure âgées de trois jours, 6 jours, 12 jours, 20 jours, 30 jours. Le départ de la fermentation est beaucoup plus rapide avec les levains les plus jeunes, mais à la fin de l'épreuve, les degrés alcooliques et les acidités volatiles sont pratiquement les mêmes.

A la suite des récentes expériences de RANKINE (85) sur les levures de vin, nous avons fait fermenter comparativement, en cinq exemplaires, quatre souches de *Sacch. ellipsoïdeus* isolées en Gironde. Les courbes de fermentation parfois voisines pour une même levure, s'écartent aussi notablement dans certains cas et on enregistre des différences de 4,5 g à 39 g dans le sucre fermenté par une même levure. Les degrés extrêmes obtenus varient de 1°8 à l'abri de l'air, de 1°5 à l'air. Il y a relativement moins d'écart entre les acidités volatiles.

Il est donc nécessaire de faire plusieurs déterminations parallèles, comme le préconise RANKINE ; il semble logique de choisir le degré alcoolique maximum pour définir la levure.

Assimilation des nitrates — L'assimilation des nitrates est une propriété que de nombreux auteurs ont utilisée en taxinomie des levures à cause de sa fidélité.

La plupart des genres n'assimilent pas les nitrates : *Saccharomyces, Pichia, Hanseniaspora, Debaryomyces*. Par contre, le genre *Hansenula* est caractérisé par son aptitude à assimiler les nitrates. Cela permet en particulier de le distinguer des *Pichia* qui présentent les mêmes autres caractères. Nous n'avons donc vraiment utilisé ce test que pour ces deux genres, ainsi que pour les *Brettanomyces*.

STELLING-DEKKER opère en milieu solide, LODDER emploie la méthode auxanographique pour la pratique courante, ne se servant du milieu liquide mis au point par WICKERHAM que pour les cas douteux. Nous avons opéré toujours en milieu liquide. On sait qu'en présence de vitamines la plupart des levures peuvent assimiler le sulfate d'ammonium, l'urée et l'asparagine. Afin de connaître les limites du développement, dans des cas douteux toujours possibles, nous avons fait nos essais avec deux témoins, l'un sans aucune substance azotée, l'autre avec une addition de sulfate d'ammonium. Pratiquement, il n'y a jamais eu de cas douteux pour les levures que nous avons étudiées.

C'est un milieu entièrement synthétique dont LODDER et K-VAN RIJ ont donné la formule :

PO_4H_2K	1 p. 1000
$SO_4Mg, 7H_2O$	0,5 p. 1000
$Cl_2Ca, 2H_2O$	0,1 p. 1000
ClNa ..	0,1 p. 1000
Glucose	10 p. 1000

Vitamines à la même dose que pour l'assimilation des sucres.

La solution est faite dans de l'eau distillée. On ajoute :

NO_3K	0,78 p. 1000
ou $SO_4(NH_4)_2$	1 p. 1000

On répartit en tubes calibrés bouchés d'un tampon d'ouate. On stérilise très rapidement comme pour le milieu destiné à l'assimilation des sucres.

On ensemence un tube de chaque milieu avec deux gouttes de culture de 3 jours. Au bout de 15 jours à 25° C on observe l'intensité du trouble produit. Le témoin sans nitrate et le témoin avec sel d'ammonium indiquent le minimum et le maximum du développement.

Utilisation de l'alcool éthylique comme seule source de carbone. — Ce test n'a qu'une valeur secondaire dans l'identification des levures ; cette propriété, en effet, appartient à quelques espèces disséminées dans plusieurs genres.

Milieu :

PO_4H_2K	1 p. 1000
SO_4Mg, 7 aq	0,5 p. 1000
$SO_4(NH_4)_2$	1 p. 1000

Les vitamines sont utilisées à la dose habituelle. On répartit en tubes calibrés et stérilise très rapidement. Au moment de l'emploi on ajoute la dose d'alcool, 3 p. 100. On ensemence avec 2 gouttes de culture de 3 jours un tube témoin sans alcool et un tube avec alcool.

On observe les résultats au bout de une ou de deux semaines à 25°C Il se produit toujours, même en l'absence d'alcool, un développement important ce qui rend l'interprétation parfois difficile.

Bilan des produits secondaires. Besoins en facteurs de croissance — Nous ne ferons pas état ici des renseignements donnés par l'analyse des produits secondaires formés, qui ont été exploités ailleurs (56), ni par la détermination des besoins en facteurs de croissance (57). Cependant, nous avons parfois utilisé ces données physiologiques pour l'identification et la classification de quelques espèces difficiles.

CHAPITRE III

DESCRIPTION DES ESPÈCES DE LEVURES ISOLÉES

En employant les méthodes décrites précédemment, nous avons examiné les levures prélevées sur 96 moûts de la région bordelaise et sur 70 échantillons de vins en refermentation qui feront l'objet du chapitre VIII.

Notre étude générale nous a permis d'isoler 2138 souches de levures. Elles se répartissent entre 6 genres sporogènes et 5 genres non sporogènes.

Nous avons groupé ensemble sans les étudier complètement, 110 souches qui n'avaient pas d'action fermentative. 31 espèces sont représentées, elles sont décrites en détail dans ce chapitre qui comporte également les photographies et les dessins que nous avons réalisés. En voici la liste et la place qu'elles occupent dans la classification générale qui se ramifie, rappelons-le, en familles, sous-familles, tribus, genres et espèces.

Les levures sporogènes constituent la famille des *Saccharomycetaceae* qui comprend cinq sous-familles : *Eremascoideae, Endomycetoideae, Saccharomycetoideae, Nematosporoideae, Lipomycetoideae*. Les levures de vin appartiennent à la seule sous-famille *Saccharomycetoideae*, qui se divise en trois tribus : *Endomycopseae, Saccharomyceteae* et *Nadsonieae*. Les deux dernières fournissent les levures de vin et chacune d'elles se compose de divers genres et espèces.

Tribu des *Saccharomyceteae* :

Genre *Saccharomyces* : *ellipsoïdeus, oviformis, bayanus, chevalieri, fructuum, carlsbergensis, uvarum, florentinus, steineri, heterogenicus, acidifaciens elegans, veronae, rouxii*.

Genre *Torulaspora* : *rosei, delbrueckii*.

Genre *Pichia* : *fermentans, membranaefaciens*.

Genre *Hansenula* : *anomala*.

Genre *Debaryomyces* : *hansenii*.

Tribu des *Nadsonieae* :

Genre *Saccharomycodes* : *ludwigii*.

Les levures non sporogènes constituent la famille des *Cryptococcaceae* et les levures identifiées se trouvent dans les sous-familles *Cryptococcoideae* et *Rhodotoruloideae* qui se divisent directement en genres :

Genre *Torulopsis* : *bacillaris, famata*.

Genre *Brettanomyces* : *vini, schanderlii*.

Genre *Candida* : *pulcherrima, mycoderma*.

Genre *Kloeckera* : *apiculata, africana, jensenii*.

Genre *Rhodotorula* : *mucilaginosa*.

I. — LEVURES SPOROGÈNES

Genre Saccharomyces Reess.

Ce genre est le plus courant et le plus abondant : nous avons trouvé 15 espèces de *Saccharomyces*.

Saccharomyces ellipsoïdeus.

Le nom le plus exact de cette espèce de levure est d'après la nomenclature moderne : *Saccharomyces cerevisiae* Hansen var. *ellipsoïdeus* (Hansen) Dekker. Mais comme il nous a paru incorrect de donner le nom de *cerevisiae* ou levures de bière, aux levures qu'on trouve sur les raisins, dans

les vendanges en fermentation et dans les vins, nous emploierons de préférence pour les désigner le terme de *Saccharomyces ellipsoïdeus*.

Sur moût de raisin, après 3 jours de culture à 25°, les cellules sont elliptiques 9 × 8 à 5 × 4 µ, quelques-unes sont plus allongées, d'autres plus arrondies. Elles se présentent isolées ou par deux, le bourgeon restant adhérent à la cellule mère pendant quelque temps. Le liquide est légèrement trouble et recouvert d'une mousse fine, mais les caractères de sédimentation sont variables d'une souche à l'autre. Sur une culture plus âgée on ne note jamais de voile, mais il peut rester sur le tube, un anneau formé par les levures soulevées par la mousse au cours de la fermentation active. En milieu solide, malt gélosé, les cultures sont blanches, humides, plus ou moins lisses ou granuleuses, il y a peu de découpures ou des lobes peu marqués. Au bout d'un mois on peut observer des asques contenant de 1 à 4 spores, et des cellules granulées.

Sur moût gélatiné, les colonies peuvent être mates ou brillantes, elles sont en général assez grosses, souvent saillantes, ou même en forme de pain de sucre. La colonie géante se présente sous forme d'une colonie ronde plus ou moins ramifiée ou étoilée ; le centre est creux ou au contraire surélevé.

Fermentation et assimilation des glucose, maltose, saccharose, galactose et raffinose pour un tiers ; l'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile : ces deux caractères sont très variables suivant les souches et les origines.

	18 C Médoc		19 J Pomerol		19 X Sauternes	
	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile
Air	8°0	0,92	13°0	1,53	16°5	1,32
Abri de l'air	7°6	0,80	10°0	1,53	12°1	1,35

Fermentation sélective des sucres : 81 p. 100 du glucose a fermenté lorsque 50 p. 100 du fructose a disparu.

Saccharomyces oviformis OSTERWALDER.

Sur moût de raisin, 3 jours à 25° : cellules isolées ou par deux, le bourgeon restant accolé à la cellule mère. Dimensions de 9 × 7 à 5 × 4 µ, les plus grosses cellules étant les plus nombreuses. Les cellules allongées sont assez rares. Le liquide est trouble, la mousse fine ; puis le trouble sédimente et dans une culture plus âgée le liquide est limpide ayant laissé parfois quelques traces de ses niveaux antérieurs. En moût de bière gélosé, l'aspect des cellules est identique. La culture sur ce milieu solide n'est généralement pas lisse, surtout au centre ; elle est plus ou moins brillante, blanc crémeux ; il y a quelques lobes, en général peu marqués, et de fines ramifications au bord de la culture. La sporulation est plus facile à obser-

ver sur eau de carotte gélosée que sur malt gélosé : 1 à 4 spores en général.

Sur moût de raisin gélatiné les colonies prélevées en surface sont souvent en relief, mates, mais parfois aussi plates et brillantes. Les colonies géantes sur moût de raisin gélatiné ne sont pas caractéristiques, et ne se distinguent pas de celles des autres *Saccharomyces*.

Fermentation et assimilation des glucose, maltose, saccharose et raffinose pour un tiers. Le galactose n'a pas fermenté, et n'est pas assimilé. L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	15 XVI Sainte Foy la Grande		8 XIV Haut Montravel		19 XIII Sauternes	
	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile
Air	18°3	1,19	15°3	0,98	17°8	1,10
Abri de l'air	12°5	1,04	12°2	0,67	12°4	0,86

Il y a quelques variations dans ces caractères, mais d'une façon générale les souches de *Sacch. oviformis* ont des pouvoirs alcoogènes très élevés. On les trouve surtout à la fin de la fermentation.

Fermentation sélective des sucres : cette espèce fait fermenter 81 p. 100 du glucose lorsque 50 p. 100 du fructose est consommé.

Saccharomyces bayanus SACCARDO.

Sur moût de raisin, 6 jours à 25° : les cellules sont elliptiques 8 × 7 à 5 × 4 μ, isolées ou groupées par deux. Sur malt gélosé, la culture a une surface plus ou moins lisse avec des granulations, parfois des trous. Les spores sont au nombre de 1 à 4. Sur moût gélatiné, les colonies peuvent être brillantes, en relief. Les colonies géantes sur moût gélatiné ont un centre creux entouré d'un bourrelet, puis d'une bordure à cannelures et festons réguliers.

Fermentation et assimilation des glucose, maltose, saccharose, raffinose pour un tiers. Le galactose n'a pas fermenté, et n'est pas assimilé.

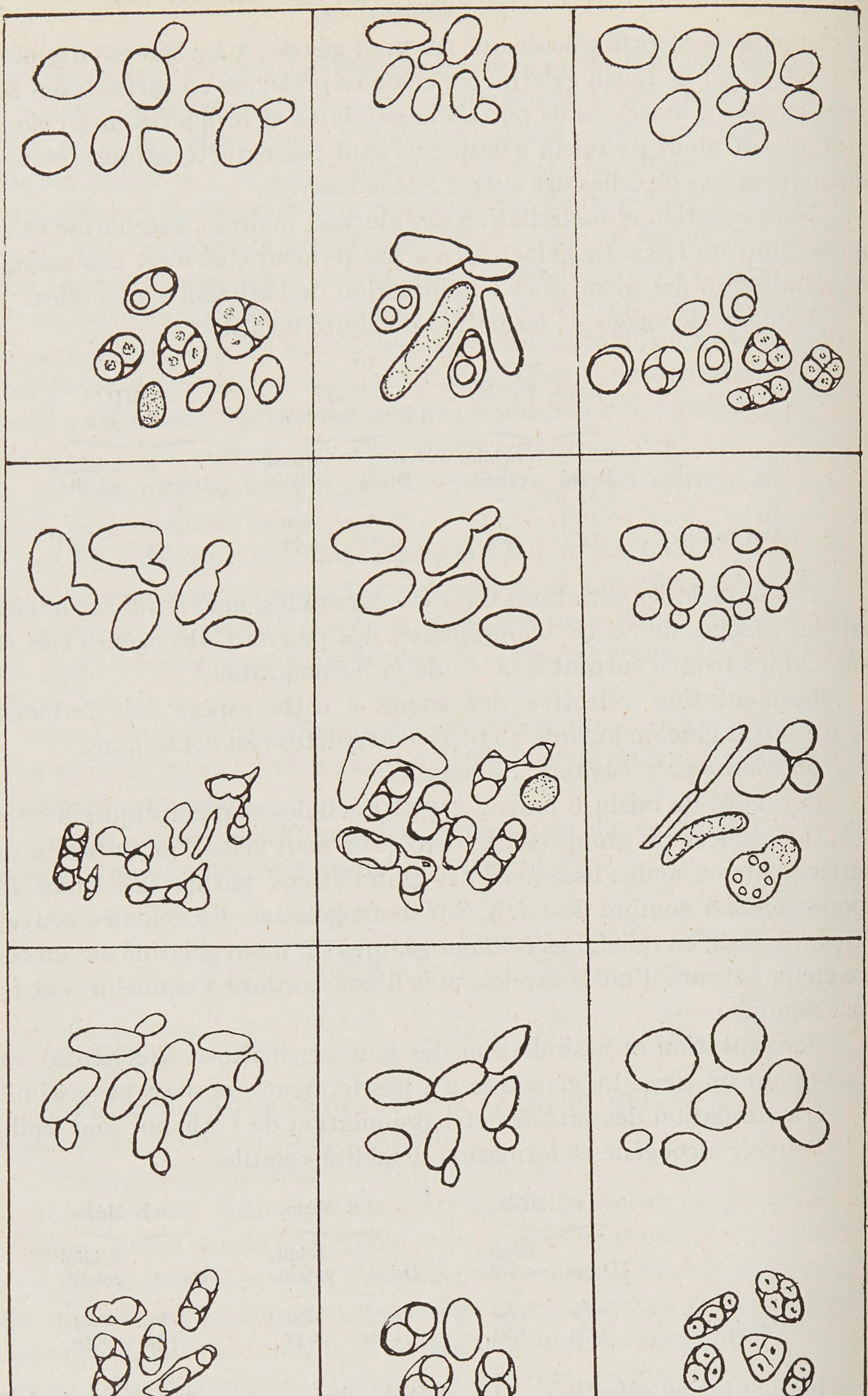
L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile.

	14 C Médoc		14 E Médoc		20 E Médoc	
	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile
Air	13°0	1,90	13°3	1,90	12°8	1,84
Abri de l'air	11°4	1,65	11°9	1,35	11°3	1,50

Fermentation sélective : 84 p. 100 de glucose pour 50 p. 100 de fructose.

DISCUSSION. — Les trois souches de *Sacch. bayanus* isolées ne présentent pas d'après les tests employés habituellement de différences fondamentales



Dessins à l'échelle 1 000

En haut : culture sur moût de raisin. en bas : culture sur milieu solide. Par colonnes à partir de la gauche *Sacch. oviformis, S. acidifaciens, S. heterogenicus, — Sacch. uvarum, Sacch. elegans, Sacch. steineri, — Sacch. chevalieri, Sacch. veronae, Sacch. ellipsoïdeus.*

avec *Sacch. oviformis*. Mais les besoins en facteurs de croissance déterminés par ailleurs par Mlle LAFOURCADE (57), les pouvoirs alcoogènes et la formation d'acidité volatile se sont montrés si différents que nous avons maintenu ces trois levures parmi l'espèce *Sacch. bayanus*.

Saccharomyces chevalieri GUILLIERMOND.

En moût de raisin au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont isolées ou par deux (cellule mère et bourgeon) 10 × 8, 8 × 6 à 5 × 4 μ, de forme elliptique. Le liquide est trouble et la mousse fine ; la sédimentation se fait assez rapidement laissant le liquide limpide et quelques dépôts sur la paroi du tube. En moût de bière gélosé, l'aspect des cellules est identique. La culture présente quelques rides dans la partie centrale tandis que la bordure est plate, plus ou moins brillante et les lobes sont peu marqués. La sporulation est fréquente sur malt gélosé et eau de carotte gélosée : 1 à 4 spores. Sur moût gélatiné les colonies peuvent présenter tous les aspects : mats ou brillants, plats ou en relief. Les colonies géantes sur moût gélatiné, présentent un creux central et des ramifications arborescentes ; elles sont mates ou brillantes.

Fermentation et assimilation des glucose, saccharose, galactose, raffinose pour un tiers. Le maltose n'a pas fermenté, et n'est pas assimilé. L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile : ces deux caractères sont assez variables selon les souches.

	20 B Médoc		2 VII Saint Emilion		17 VII Barsac	
	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile
Air	13°3	1,90	12°5	1,90	15°2	1,35
Abri de l'air	11°1	1,40	11°0	1,47	11°7	0,95

Fermentation sélective : 84 p. 100 de glucose pour 50 p. 100 de fructose.

Saccharomyces fructuum LODDER et K-VAN RIJ.

Au bout de 3 jours à 25°, sur moût de raisin, les cellules sont grosses, plutôt allongées, isolées ou par petites chaînes de 2 à 3 éléments : 10 × 6 à 6 × 4 μ. Sur malt gélosé, les cellules ont le même aspect qu'en milieu liquide. La sporulation est assez facile à observer : les asques renferment de 1 à 3 spores. Sur moût de raisin le liquide se trouble au bout de 3 jours ; le sixième jour, la sédimentation n'est pas toujours terminée. Plus tard, le liquide est tout à fait limpide : on relève quelques dépôts sur les parois du tube. Sur malt gélosé, les cultures sont en général lisses, brillantes, peu découpées ; sur eau de carotte gélosée, elles sont plus plissées, ridées. Les colonies géantes sur moût gélatiné ont un centre creux entouré d'une zone blanche, sèche, finement ramifiée, plus ou moins largement découpée.

Fermentation et assimilation des glucose, saccharose, galactose et

raffinose pour un tiers. Le maltose n'a pas fermenté, mais il est assimilé. L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	6 XIV Médoc		5 F Saint-Emilion		8 VI Entre-Deux-Mers	
	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile
Air	11°1	1,65	13°9	2,02	15°4	0,92
Abri de l'air	8°2	1,47	10°8	1,41	8°8	0,98

Fermentation sélective : 84 p. 100 du glucose pour 50 p. 100 du fructose.

REMARQUE. — *Sacch. fructuum* ne se distingue de *Sacch. chevalieri* que par le test d'assimilation du maltose qui est positif pour *Sacch. fructuum*, négatif pour *Sacch. chevalieri*.

Saccharomyces carlsbergensis HANSEN.

Sur moût de raisin, 3 jours à 25°, les cellules sont isolées ou en chaînes de 2 à 4 ou 5 éléments. Elles sont assez grosses, plutôt allongées, 11 × 9 et 11 × 6 à 6 × 5 µ ; sur malt gélosé, l'aspect est le même qu'en milieu liquide. Les spores ont été observées, il y en a de 1 à 4 par asque. La culture en milieu liquide est trouble au bout de 3 jours, mais la sédimentation se fait vite et par la suite, le liquide devient parfaitement limpide. En milieu solide la culture est lisse, humide, brillante, d'un blanc crémeux, parfois un peu festonnée. Sur moût gélatiné, les colonies monocellulaires sont en général grosses, mates et en piton. La colonie géante présente un grand creux central ; elle est peu découpée, développée presque entièrement dans la profondeur de la gélatine et finement ramifiée. Il peut y avoir des lobes larges et des zones concentriques.

Fermentation et assimilation des glucose, maltose, saccharose, galactose et raffinose complètement.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	10 C Monbazillac		8 VII Entre-Deux-Mers		14 V Graves blancs	
	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile
Air	9°8	0,86	11°4	0,88	7°3	0,86
Abri de l'air	7°5	0,61	6°7	0,43	6°7	0,61

Fermentation sélective : 86 p. 100 du glucose pour 50 p. 100 du fructose.

Saccharomyces uvarum BEIJERINCK.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont ovales, quelques-unes sont beaucoup plus allongées ; elles sont groupées parfois en chaînes de 2 éléments : 9 × 4, 8 × 6, 5 × 3, 15 × 3 µ. Sur malt gélosé, l'aspect des cellules est le même. La sporulation n'a pas toujours

été visible, mais nous avons pu cependant observer sur eau de carotte de 1 à 4 spores. Sur moût de raisin, le liquide, trouble au bout de 3 jours, se clarifie par la suite ; au bout d'un mois il est limpide et l'on observe des anneaux blancs et parfois un voile. En milieu solide, la culture est mate, beige foncé, sans relief, unie, mais elle peut être finement ridée au centre, alors que la bordure est plate et mince, sur eau de carotte gélosée. Sur moût de raisin gélatiné, *Sacch. uvarum* s'est développé en grosses colonies mates. Les colonies géantes sur moût gélatiné sont minces, assez grosses, mais peu découpées et sans grand relief.

Fermentation et assimilation des glucose, maltose, saccharose, galactose et raffinose complètement.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'alcool sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	7 I Entre-Deux-Mers		18 D Médoc		20 C Médoc	
	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile
Air	8°0	0,67	7°1	1,04	9°3	1,04
Abri de l'air	7°9	0,55	7°7	0,82	7°4	0,86

Fermentation sélective : 85 p. 100 de glucose pour 50 p. 100 de fructose.

Saccharomyces florentinus (CASTELLI) LODDER et K-VAN RIJ.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont rondes à elliptiques, plutôt petites, isolées ou groupées par deux 6 × 5, 5 × 4, 4 × 4, 4 × 3 μ. Sur malt gélosé, les cellules ont à peu près le même aspect, mais elles sont plus petites et plus groupées. Nous avons pu observer la sporulation sur eau de carotte : des asques à deux et trois spores étaient visibles. Sur moût de raisin, au bout de 3 jours, le liquide est légèrement trouble, mais la sédimentation se produit rapidement et au bout de 6 jours les dépôts compacts de cellules sont difficiles à désagréger par agitation. Sur malt gélosé, la culture est blanche, brillante, humide, avec un certain relief, elle forme des lobes plus ou moins bien marqués. Sur moût gélatiné, la colonie géante est large, mince, elle forme de larges lobes, bordés de fines ramifications.

Fermentation et assimilation des glucose, maltose, saccharose, galactose, et raffinose complètement.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	16 A Médoc		1 e 4 Médoc		5 O 1ères Côtes de Bordeaux Blanc	
	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile
Air	9°3	0,95	13°9	1,28	9°0	0,30
Abri de l'air	6°3	0,80	11°9	1,00	8°1	0,12

Discussion. — Nous nous trouvons en présence de levures ayant une même propriété caractéristique, celle de faire fermenter le mélibiose et par conséquent le raffinose entièrement. La classification nous donne quatre identifications possibles : *Sacch. florentinus, carlsbergensis, logos, uvarum.* Si l'hypothèse *Sacch. logos* peut être aisément écartée à cause de la dimension des cellules et par le fait que cette espèce n'a jamais été trouvée dans le vin, le choix parmi les autres est plus difficile.

En considérant la forme des cellules et le pouvoir alcoogène, nous pouvons discerner parmi les levures isolées : des souches de *Sacch. florentinus* : petites cellules presque rondes qui conservent cet aspect en culture âgée sur malt gélosé,

— des souches de *Sacch. uvarum* qui montrent des formes allongées analogues à celles de la souche authentique du C. B. S.,

— enfin, nous groupons parmi les *Sacch. carlsbergensis* toutes les autres souches qui ont des cellules assez grosses, se rapprochant de la souche du C. B. S. Les pouvoirs fermentatifs sont en général un peu plus élevés.

Saccharomyces steineri Lodder et K-Van Rij et *Saccharomyces italicus* Castelli.

L'identification des souches répondant aux caractéristiques de *Sacch. steineri* et de *Sacch. italicus* s'est montrée particulièrement délicate. Ces deux levures, de découverte assez récente, ne se différencient que dans la manière de faire fermenter le saccharose. D'après Castelli, la fermentation du saccharose est nulle avec *Sacch. italicus*, elle est nulle ou très faible d'après Lodder et K-Van Rij, mais l'assimilation aérobie est positive ; quant à *Sacch. steineri*, il fait fermenter activement le saccharose. La distinction semble donc reposer sur le fait que *Sacch. italicus* ne possède pas d'invertase alors que *Sacch. steineri* possède cet enzyme.

En réalité, il nous est apparu que les souches authentiques de *Sacch. italicus*, fournies par le C B S ou dont l'identification a été confirmée par Castelli, arrivent toujours à faire fermenter des traces de saccharose dans le test habituel en milieu au bouillon de levure. Il suffit de prolonger 8 ou 15 jours les observations pour obtenir un dégagement visible de gaz carbonique dans la clochette de Durham. De plus, on constate qu'il y a tous les intermédiaires dans la vitesse de fermentation du saccharose sur bouillon de levure, lorsqu'on étudie une série de souches isolées de raisins de la Gironde.

En opérant en milieu synthétique complet, dans lequel l'azote se trouve uniquement sous forme de sels d'ammonium et d'asparagine, on s'aperçoit que *Sacch. italicus* fait fermenter aussi bien le saccharose que *Sacch. steineri* : le départ de la fermentation est pratiquement aussi rapide et la quantité de saccharose fermenté est la même.

La production de saccharase par ces levures dépend donc étroite-

ment de la composition du milieu de fermentation. Une étude plus complète a été consacrée à ce problème. Nous pensons en conséquence qu'il n'y a pas lieu de conserver la distinction entre ces deux espèces que nous grouperons sous le nom de *Sacch. steineri*, Steiner ayant eu l'antériorité de sa découverte en 1924.

DESCRIPTION. — Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont plutôt allongées, isolées ou groupées par deux, 10 × 4 à 5 μ à 6 × 5 μ. Sur malt gélosé les cellules ont un aspect à peu près identique. La sporulation s'observe assez difficilement, néanmoins on a trouvé des asques à une et deux spores. Sur moût de raisin, au bout de 3 jours, le liquide est limpide, les levures forment au fond du tube des amas faciles à désagréger et un anneau au-dessus de la mousse. Au bout d'un mois le liquide est limpide et on peut observer des dépôts sur la paroi des tubes. Sur malt gélosé et eau de carotte gélosée, les cultures peuvent être blanches ou colorées (beige ou blanc jaunâtre), lisses ou plus ou moins granuleuses, parfois même ridées, mais la bordure est toujours lisse, ramifiée ou non.

Fermentation et assimilation des glucose, maltose, saccharose (parfois très faible sur eau de levure), galactose. Le raffinose n'a pas fermenté.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'alcool sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile.

	144 C B S		15 C Médoc		6 XI Saint-Emilion	
	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile
Air	11°8	1,32	12°3	1,84	14°2	1,35
Abri de l'air	11°2	1,14	12°0	1,40	10°4	1,16

Fermentation sélective : 84 p. 100 de glucose pour 50 p. 100 de fructose.

Saccharomyces heterogenicus OSTERWALDER.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont allongées, isolées ou par deux ; 10 × 3 ou 4 μ, 8 × 4 ou 3 jusqu'à 5 × 4 μ. Sur malt gélosé, les cellules ont à peu près le même aspect. La sporulation est visible sur malt gélosé et sur eau de carotte gélosée : 1 à 4 spores rondes par asque. Sur moût de raisin, le liquide au bout de trois jours est légèrement troublé par des levures en flocons ; au bout de 6 jours, le trouble persiste ; par la suite, au bout d'un mois, le liquide est limpide et de légères traces restent sur le tube. En milieu solide la culture est unie, lisse, sauf dans la partie centrale un peu plus épaisse et un peu plus granulée ; il n'y a pas de découpures mais parfois de fines ramifications sous la gélose. Sur eau de carotte les cultures sont blanches, mates, plus ou moins ridées. Les colonies géantes ne présentent rien de caractéristique même sur moût gélatiné.

Fermentation et assimilation des glucose, maltose et saccharose. Le galactose n'a pas fermenté, et n'est pas assimilé ; le raffinose n'a pas fermenté.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	14 D Graves		17 XVIII Barsac		23 XI Sauternes	
	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile
Air.............	14°8	0,98	14°5	1,22	11°0	0,06
Abri de l'air	11°7	0,79	10°4	0,92	9°9	0,46

Fermentation sélective : 83 p. 100 de glucose pour 50 p. 100 de fructose.

Discussion. — Les caractères morphologiques des *Sacch. heterogenicus* trouvés en Gironde ne correspondent pas tout à fait à la description donnée par Lodder et K-Van Rij, ces levures ont une forme généralement plus arrondie, plus elliptique que la souche authentique. Mais leurs propriétés fermentatives et en particulier leur capacité de faire fermenter le saccharose et de ne pouvoir attaquer le raffinose, correspondent parfaitement à la diagnose de cette espèce.

Saccharomyces acidifaciens (Nickerson) Lodder et K- Van Rij.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont grosses, allongées, isolées ou groupées par deux, 10×6 à 7×5 µ et 5×4 µ ; les petites cellules sont plutôt arrondies. Sur malt gélosé, l'aspect des cellules est semblable. La sporulation est facile à observer sur malt gélosé et sur milieu à l'eau de carotte. Les asques contiennent de 1 à 4 spores rondes. En général, la formation de l'asque est précédée par une conjugaison isogamique ; parfois c'est une conjugaison hétérogamique et parfois, même, la formation de l'asque n'est pas précédée par la conjugaison. Sur moût de raisin, au bout de 3 jours, le liquide peut être légèrement trouble ou limpide. Au bout de 6 jours, le liquide est surmonté de grosses bulles irisées, formant une mousse stable, et qui se maintiennent longtemps et très haut dans le tube. Cette propriété a été observée chaque fois que *Sacch. acidifaciens* était cultivé sur moût de raisin ; mais cette mousse spéciale ne s'est jamais formée sur moût de bière.

Sur malt gélosé, les cultures sont plutôt mates, parfois légèrement colorées de jaune rosé, assez lisses, sans découpures. Sur milieu de Malan, les cultures sont généralement blanches ou rosées, mates. Sur moût gélatiné, *Sacch. acidifaciens* forme de petites colonies. Les colonies géantes sur moût gélatiné sont amorphes, mates, légèrement rosées.

Fermentation et assimilation seulement du glucose. Les autres sucres

ne fermentent pas et ne sont pas assimilés. On observe parfois une légère assimilation aérobie du galactose.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	142 C B S		12 X Monbazillac		22 XVII Sauternes	
	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile
Air.............	8°2	0,60	8°2	0,24	9°0	1,10
Abri de l'air	3°8	0,81	10°0	0,21	9°7	1,04

Fermentation sélective : contrairement aux *Saccharomyces* déjà décrits, cette levure n'a fait fermenter que 6 p. 100 du glucose alors que déjà 50 p. 100 du fructose a disparu.

Saccharomyces elegans LODDER et K-VAN RIJ.

Sur du moût de raisin au bout de 3 jours à 25°, les cellules elliptiques sont allongées ; elles sont isolées ou groupées par deux 10 × 4 à 7 × 5 μ ; sur malt gélosé, les cellules sont plus courtes. La sporulation est facile à observer sur malt gélosé et sur eau de carotte gélosée. Il y a deux à quatre spores par asque, grosses et rondes. Une conjugaison isogamique précède la formation de l'asque. Sur moût de raisin, au bout de 3 jours le liquide est généralement limpide avec des levures en flocons en suspension, et en dépôt. Au bout de 6 jours environ apparaissent de grosses bulles irisées qui se maintiennent très longtemps et très haut dans le tube (propriété commune avec *Sacch. acidifaciens*). Nous ne les avons pas observées sur moût de bière. Le liquide au bout d'un mois est limpide avec de légers dépôts laissés sur les parois par les bulles. Sur malt gélosé la culture est blanche, parfois légèrement colorée, avec des granulations fines ou quelques rides, et quelques lobes. Ces colonies isolées sur moût gélatiné étaient petites, parfois granuleuses et festonnées. Les colonies géantes sur moût gélatiné sont rosées, amorphes, avec quelques petits festons mais aucune ramification.

Fermentation et assimilation des glucose et saccharose. Par contre, le galactose, le maltose et le raffinose ne fermentent pas et ne sont pas assimilés.

L'assimilation des nitrates est nulle. L'assimilation de l'éthanol également ou devient faiblement positive à la longue.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	143 C B S		23 E Sauternes		20 VIII Sauternes	
	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.
Air.............	10°8	0,48	13°0	1,10	11°0	0,12
Abri de l'air	7°9	0,60	10°0	0,98	10°5	0,37

Fermentation sélective : 6 p. 100 du glucose seulement fermentent pour 50 p. 100 du fructose.

Discussion. — Dans une solution de sucre inverti *Sacch. acidifaciens* et *Sacch. elegans* possèdent en commun la propriété de faire fermenter sélectivement le fructose d'une façon très nette. Au cours des tests de fermentation, nous avons pu avoir parfois quelques difficultés à distinguer les deux espèces qui ne sont séparées que par la capacité de *Sacch. elegans* à faire fermenter le saccharose, parfois faiblement.

Ces deux levures ont également en commun une propriété que nous n'avons vue décrite nulle part, sans doute parce que le milieu moût de raisin est peu employé, celle de former une mousse stable faite de grosses bulles irisées. Le pouvoir alcoogène de *Sacch. elegans* est un peu plus élevé que celui de *Sacch. acidifaciens.*

Saccharomyces veronae Lodder et K-Van Rij.

Sur moût de raisin au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont à peu près rondes : 6 × 5 à 4 × 3 et 3 × 3 µ, isolées, ou groupées par deux. Sur malt gélosé, les cellules ont un aspect identique. La sporulation a été difficile à observer : 1 à 4 spores. Sur moût de raisin, le liquide est limpide laissant quelques dépôts sur la paroi. Sur malt gélosé : la culture est blanc jaunâtre, assez épaisse, assez brillante, mais pas lisse, peu étendue. Des bulles crevées font apparaître des rides. Sur moût gélatiné, les colonies sont assez grosses en surface, petites et brunes dans la profondeur de la gélatine. La colonie géante sur moût gélatiné est mate, jaunâtre, assez grosse. Le centre est légèrement déprimé, mais avec de petites colonies rondes en relief ; la bordure cannelée est à peine découpée, un anneau saillant sépare le centre et la bordure.

Fermentation et assimilation des glucose et saccharose et du tiers du raffinose. Les maltose et galactose ne fermentent pas ou faiblement, mais ils sont assimilés.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alccoogène et formation d'acidité volatile :

	146 C B S		7 XI Sainte-Croix-Du-Mont	
	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.
Air	10°8	0,14	8°6	0,18
Abri de l'air	6°5	0,45	8°5	0,09

Fermentation sélective : 58 p. 100 du glucose pour 50 p. 100 du fructose.

Sacch. veronae est le seul *Saccharomyces* qui fait fermenter à peu près également glucose et fructose.

Discussion. — La levure 7 XI de notre collection que nous avions classée comme *Sacch. veronae*, nous paraissant difficile à identifier, nous l'avons adressée au Prof. Castelli qui a confirmé qu'elle répondait aux caractéristiques de *Sacch. veronae.*

Au point de vue test de fermentation, nous avons pu constater que même après une purification supplémentaire par passage sur boîte de Pétri, cette souche finissait par faire fermenter tous les sucres au bout d'un temps plus ou moins long (tableau ci-dessous). LODDER et K-VAN RIJ signalent une fermentation possible du maltose, mais leur souche reste incapable de faire fermenter le galactose.

	Essai n° 1		Essai n° 2			Essai n° 3		
	2 jours.	21 jours.	1 jour.	7 jours.	13 jours.	1 jour.	7 jours.	13 jours.
Maltose.......	—	— + (1)	—	—	+ (3)	—	+ (4)	+
Galactose	—	+	—	+ (2)	+	—	—	+ (5)

(1) Devient + par agitation : remontée de bulles retenues dans le dépôt. — (2) Une bulle. — (3) Clochette entière. — (4) Une bulle. — (5) Quelques petites bulles.

Saccharomyces rouxii BOUTROUX.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont assez rondes, groupées en amas, 7 × 5 à 4 × 4 μ. Sur malt gélosé, les cellules présentent à peu près le même aspect. La sporulation est difficile à observer. Sur eau de carotte gélosée nous avons observé 1 à 3 spores. Sur moût de raisin on assiste, comme pour *Sacch. acidifaciens* et *Sacch. elegans*, à la formation d'une mousse irisée au-dessus des cultures. Sur malt gélosé, les cultures sont blanches, brillantes, mais granuleuses, tourmentées, avec des bulles éclatées. La colonie géante sur moût gélatiné est mate, légèrement rosée, avec des festons réguliers blancs.

Fermentation des glucose et maltose, assimilation des glucose, maltose et galactose. Le saccharose ne fermente pas et n'est pas assimilé.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	I Sirop de Cassis	
	Degré.	Acidité volatile.
Air..	13°3	0,09
Abri de l'air..............................	8°5	0,24

Fermentation sélective : 11 p. 100 de glucose pour 50 p. 100 de fructose. Cette levure partage avec *Sacch. acidifaciens* et *Sacch. elegans* la propriété de faire fermenter sélectivement le fructose.

Genre Saccharomycodes Hansen.

On ne connaît qu'une seule levure appartenant à ce genre. Nous l'avons rencontrée dans les vins de Bordeaux.

Saccharomycodes ludwigii HANSEN.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours, à 25°, les cellules sont de forme apiculée, mais très grosses : 20 × 6, 18 × 5, 10 × 6, 8 × 4 μ. Elles

sont isolées ou groupées par deux. Le bourgeon se forme à l'un des pôles. Sur malt gélosé, l'aspect des cellules est à peu près le même. La sporulation est facile à observer sur malt gélosé : il y a 3 ou 4 spores par asque, grosses et rondes. Sur moût de raisin, le liquide de culture est déjà limpide au bout de 3 jours. Par la suite, le dépôt est formé de flocons. Sur malt gélosé, la culture est beige, brillante, mais pas absolument lisse, quelques petites granulations. La colonie géante sur moût gélatiné est mate, légèrement rosée, plus ou moins épaisse, peu découpée ou avec des festons courts et petits.

Fermentation et assimilation des glucose, saccharose et raffinose pour un tiers. Les maltose et galactose ne fermentent pas et ne sont pas assimilés.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'alcool sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	6 XVII Entre-Deux-Mers		Vin blanc en cuve		Vin blanc en bouteille	
	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.
	—	—	—	—	—	—
Air............	13°0	0,37	11°8	0,79	12°2	0,83
Abri de l'air	12°3	0,30	10°6	0,64	10°5	0,64

Fermentation sélective : 81 p. 100 du glucose pour 50 p. 100 du fructose.

Cette levure est rare lors de la fermentation du moût : nous n'en avons trouvé qu'une souche. Par contre elle est très fréquente dans la refermentation des vins sucrés. Elle a une résistance marquée à l'anhydride sulfureux.

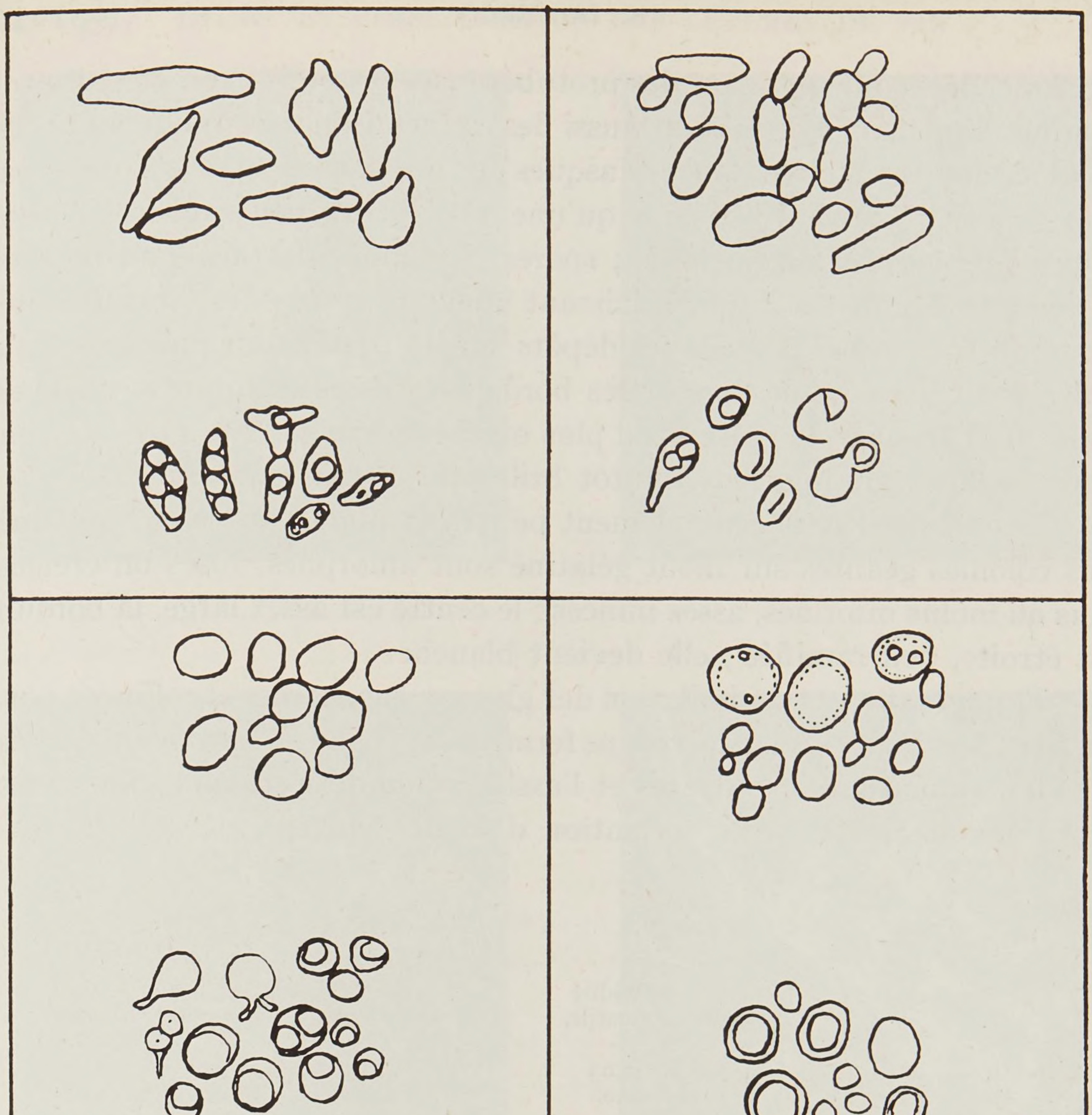
Genre Torulaspora Lindner.

Lodder et K-Van Rij n'ont pas conservé dans leur classification le genre *Torulaspora* et ont classé cette levure dans le genre *Saccharomyces*. Cependant, leur forme ronde, certains caractères physiologiques, notamment la formation pratiquement inexistante d'acide acétique, leurs besoins particuliers en facteurs de croissance, rendent ces levures très différentes des *Saccharomyces*. Avec les auteurs italiens, nous conservons donc le genre *Torulaspora* à cause de l'intérêt oenologique qu'il présente.

Il est représenté dans les vins par deux espèces.

Torulaspora rosei Guilliermond.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont à peu près rondes, 6×5, 5×5, 4×3 μ, isolées, groupées par deux ou en petits amas. Le bourgeonnement est souvent multipolaire. Sur malt gélosé, les cellules présentent le même aspect qu'en milieu liquide. La sporulation se produit sur malt gélosé, et sur milieu gélosé à l'eau de carotte. On observe



Dessins à l'échelle 1 000

En haut : culture sur moût de raisin, en bas : culture sur milieu solide. Par colonnes à partir de la gauche *Saccharomycodes ludwigii, Torulaspora rosei, Torulopsis bacillaris,* — *Hansenula anomala, Candida pulcherrima, Kloeckera apiculata, Kloeckera africana,*

sur les cellules qui sporulent des protubérances ressemblant à des tubes de conjugaison, mais il se produit aussi des conjugaisons isogamiques et hétérogamiques. On trouve dans les asques de une à trois spores rondes pas très grosses. Quand il n'y en a qu'une, elle est un peu excentrée. Nous avons pu observer un asque à 4 spores. Sur moût de raisin, au bout de 6 jours, le liquide est limpide, laissant quelques traces des niveaux antérieurs de la mousse et quelques dépôts sur les parois. Sur malt gélosé, la culture est lisse, blanc crème ; les bords sont lisses et forment quelques lobes. Par la suite, la culture est plus ou moins crème, lisse mais souvent avec de fines granulations, plutôt brillante, d'épaisseur uniforme.

Les colonies sont généralement petites et plates, sur moût gélatiné. Les colonies géantes sur moût gélatiné sont amorphes, roses ou crèmes, plus ou moins informes, assez minces ; le centre est assez large, la bordure est étroite, peu ramifiée ; elle devient blanche.

Fermentation et assimilation des glucose, saccharose et raffinose pour un tiers. Les maltose et galactose ne fermentent pas et ne sont pas assimilés.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	28 VI Puisseguin		3 F 1 ères Côtes de Bordeaux		2 XIV Graves	
	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.
Air	11°7	0,03	8°4	0	13°0	0
Abri de l'air	8°3	0,06	6°6	0,18	12°7	0,24

On peut observer que ces levures forment un degré alcoolique assez élevé et une acidité volatile très faible. Elles ont donc un certain intérêt œnologique.

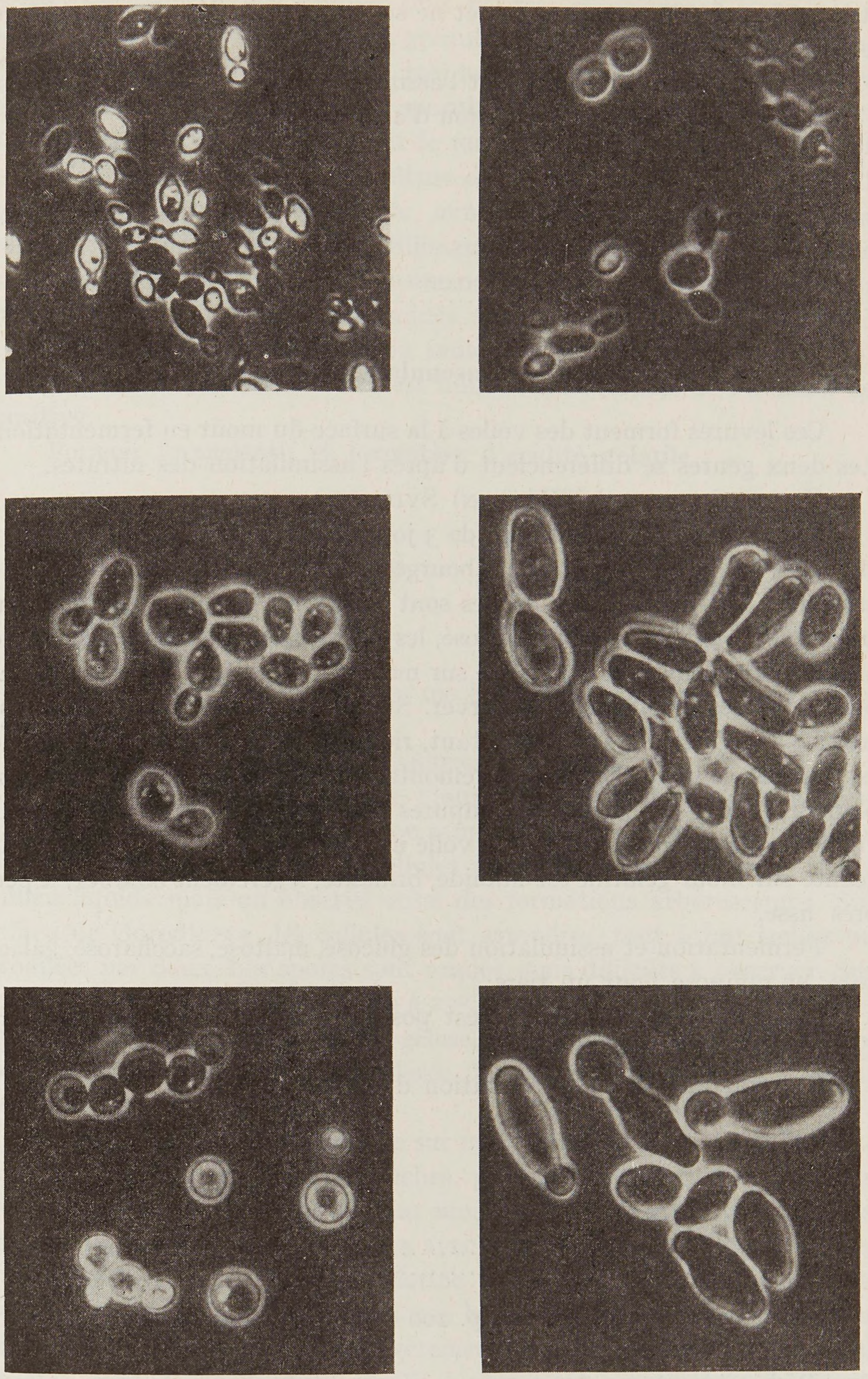
Fermentation sélective : 57 p. 100 de glucose pour 50 p. 100 de fructose.

Torulaspora delbrueckii LINDNER.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont plutôt rondes 9 × 7, 8 × 7 μ à 6 × 5, 6 × 4 μ. isolées ou groupées par deux. Sur malt gélosé elles ont le même aspect, mais présentent rapidement un granule brillant. La sporulation se produit mais les asques sont rares au milieu de cellules remplies de granulations ; ceux que nous avons observés contenaient deux spores.

La culture sur moût de raisin est limpide dès le début. Sur malt gélosé elle se développe d'abord sous forme d'une pâte blanche ou beige, brillante et lisse, avec quelques granulations au centre et des lobes à peine marqués, puis devient plutôt mate par la suite. La colonie géante sur moût gélatiné est assez informe, elle blanchit rapidement.

Fermentation et assimilation des glucose et galactose. Les maltose



Photographies de cultures sur moût de raisin G = 1 000.

De haut en bas et par colonnes : *Kloeckera apiculata, Sacch. chevalieri, Torulaspora rosei.* — *To ulopsis bacillaris, Sacch. elegans, Saccharomycodes ludwigii.*

et saccharose ne fermentent pas et ne sont pas assimilés ; le raffinose ne fermente pas.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	I. IV. Premières Côtes	
	Degré.	Acidité volatile.
Air	13°7	0,73
Abri de l'air	11°0	1,07

Genres Hansenula et Pichia.

Ces levures forment des voiles à la surface du moût en fermentation. Les deux genres se différencient d'après l'assimilation des nitrates.

Hansenula anomala (HANSEN) SYDOW.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont plutôt allongées 10 × 3 à 4 × 3 µ. Le bourgeonnement se fait soit au pôle de la cellule, soit à côté. Les cellules sont isolées ou groupées par deux ou en chaînes. Sur moût de bière gélosé, les cellules ont à peu près le même aspect. La sporulation est visible sur malt gélosé, mais les spores en chapeau sont assez difficiles à observer. Sur moût de raisin, le liquide est trouble avec un voile très remontant, ridé. Au bout d'un mois, le liquide est trouble, le voile est plissé et remontant. Sur malt gélosé, la culture est blanche, mate, unie, sans découpures ou très abondante, de couleur crème, brillante, recouverte d'un voile mat plus ou moins ridé. La colonie géante sur moût gélatiné est humide, brillante, légèrement bombée, à peu près lisse.

Fermentation et assimilation des glucose, maltose, saccharose, galactose, et raffinose pour un tiers.

L'assimilation des nitrates est positive, ainsi que l'assimilation de l'éthanol.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	20 h 1 Pomerol		26 XII Puisseguin	
	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.
Air	10°6	0,52	4°1	0,61
Abri de l'air	5°3	0,52	2°8	1,68

Fermentation sélective : 60 p. 100 de glucose pour 50 p. 100 de fructose.

Pichia fermentans LODDER.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont plutôt allongées 20 × 2 à 3 µ souvent disposées en chaînes arborescentes ; on

observe également des cellules plus petites, elliptiques 8 × 5, 6 × 4, 3 × 2, 6 × 2 μ. Il y a souvent un granule brillant à l'intérieur des cellules. Sur malt gélosé, les cellules sont très longues, ramifiées en arborescences avec des cellules plus petites. La sporulation est assez difficile à observer. Les spores sont rondes. Sur moût de raisin, le liquide est trouble, le voile plissé (au bout de 3 jours) ; la culture a une odeur désagréable. Sur malt gélosé, la culture est blanchâtre, mince, mate, sèche avec des grains blancs. Elle devient jaune en vieillissant, sa surface est ridée ; la culture remonte sur le tube en un réseau finement ramifié. La colonie géante sur moût gélatiné est jaune, mate, mince avec un anneau un peu en relief.

Fermentation et assimilation seulement du glucose.

L'assimilation des nitrates est nulle, l'assimilation de l'éthanol est positive.

Pouvoir fermentatif et formation d'acidité volatile :

	4 p 1 Médoc		18 XVIII Médoc		7 P Ste-Croix-du-Mont	
	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.
Air	11°1	0,73	13°0	0	10°7	0,37
Abri de l'air	7°7	0,73	9°3	0,51	5°1	0,70

Fermentation sélective : 84 p. 100 du glucose pour 50 p. 100 du fructose.

Pichia membranaefaciens HANSEN.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont allongées, en chaînes plus ou moins longues ou ramifiées 10 × 3 μ, 8 × 4, à 3 × 2 μ. Sur moût de bière gélosé, les cellules isolées sont plus arrondies qu'en milieu liquide mais on observe aussi des formations arborescentes. Sur milieu de Gorodkowa, les cellules sont arrondies, tout à fait isolées ou groupées par deux. Les spores sont rondes, mais difficiles à observer. Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, le liquide est à peu près limpide, le voile plissé. Sur moût de bière gélosé, la culture est mate, très mince, très finement ridée, devenant colorée, brunâtre, avec de fines arborescences en surface.

Dans certains cas, les colonies sur moût gélatiné ont liquéfié la gélatine. Elles sont parfois mates, sèches, granuleuses, ou ridées, blanches ou jaunes. Les colonies géantes sur moût gélatiné peuvent avoir divers aspects : assez épaisses, amorphes avec une bordure un peu festonnée, ou minces, enfoncées dans la gélatine en plusieurs couches, mais très larges et portant de fins rayons et une bordure ramifiée arborescente, ou bien, colonie colorée au centre (légèrement orangée), entourée d'une zone grisâtre, puis d'une bordure régulière plus claire, mate, très finement ridée. Toutes les cultures liquides ou solides dégagent une forte odeur d'acétate d'amyle.

Fermentation et assimilation du glucose seulement.

L'assimilation des nitrates est nulle. L'assimilation de l'éthanol est positive.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	7 p 1 Saint-Emilion		8 p Saint-Emilion		20 p Sauternes	
	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.
Air.............	9°0	0,27	7°8	0,86	8°6	0,18
Abri de l'air	2°3	0,46	3°0	1,04	1°8	0,52

Fermentation sélective : 54 p. 100 du glucose pour 50 p. 100 du fructose.

Discussion. — Le genre *Pichia* peut se différencier facilement du genre *Hansenula* par l'absence d'utilisation des nitrates.

Les espèces *P. fermentans* et *P. membranaefaciens* se distinguent par leur action sur le sucre inverti. *P. fermentans* a une préférence très nette pour le glucose tandis que *P. membranaefaciens* fait fermenter à peu près également les deux sucres. De plus, ces deux espèces sont différentes aux points de vue des intensités respiratoires et de fermentation (56).

Genre Debaryomyces.

Bien que non fermentative, nous avons étudié une souche de levure d'un voile, formant des spores.

Debaryomyces hansenii (Zopf) Lodder et K-Van Rij.

Sur moût de raisin au bout de 3 jours à 25°, les cellules mesurent 10 × 3, 15 × 4 μ à 6 × 4, 8 × 3, 5 × 4 μ. Sur malt gélosé, on peut observer 1 à 4 spores par asque. Sur moût de raisin, le liquide est limpide ou trouble, un voile plissé remontant est formé. Par agitation, il se désagrège en particules qui ont tendance à remonter. Pas de fermentation apparente. Sur malt gélosé, les colonies sont beige rosé, mates, très vermiculées et ridées. Les colonies géantes sont blanchâtres, non découpées, avec seulement quelques petits festons ; elles liquéfient la gélatine.

Fermentation très lente du glucose, nulle pour les autres sucres, mais ils sont tous assimilés.

L'assimilation des nitrates est nulle. L'assimilation de l'alcool est positive.

II. — LEVURES NON SPOROGÈNES

Kloeckera apiculata Janke.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules ont diverses formes, certaines sont elliptiques, petites, 3 × 2 μ ou plus allongées

(6 × 3 μ), la plupart sont de forme apiculée, tandis que d'autres sont longues, minces, avec un renflement au milieu 10 × 6 μ, 10 × 3 μ. Sur malt gélosé, les cellules sont très petites. Sur moût de raisin, le liquide est limpide laissant des traces d'anneaux superficiels. Sur malt gélosé, les cultures sont très minces, brunâtres. Sur moût gélatiné, les colonies sont très petites et liquéfient la gélatine.

Fermentation et assimilation seulement du glucose. Les autres sucres ne fermentent pas et ne sont pas assimilés.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	2 a Saint-Emilion		7 I Ste-Croix-du-Mont		16 a Médoc	
	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.
Air	4°7	1,71	6°4	0,98	5°1	1,22
Abri de l'air	3°8	1,04	4°0	1,47	4°0	0,90

Fermentation sélective : 39 p. 100 du glucose pour 50 p. 100 du fructose.

Kloeckera africana JANKE.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules ont des formes variées ; petites, elliptiques 4 × 2 et 5 × 4 μ, puis 8 × 6 μ, ou plus grosses et de forme apiculée 10 × 4, 15 × 4, 10 × 3 μ. Le liquide est légèrement trouble. Sur malt gélosé, la culture est beige, mince, humide, brillante. Sur moût gélatiné la colonie géante est très petite, mate, brune, granuleuse.

Fermentation seulement du glucose ; les glucose, maltose et saccharose sont assimilés, le galactose ne l'est pas.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

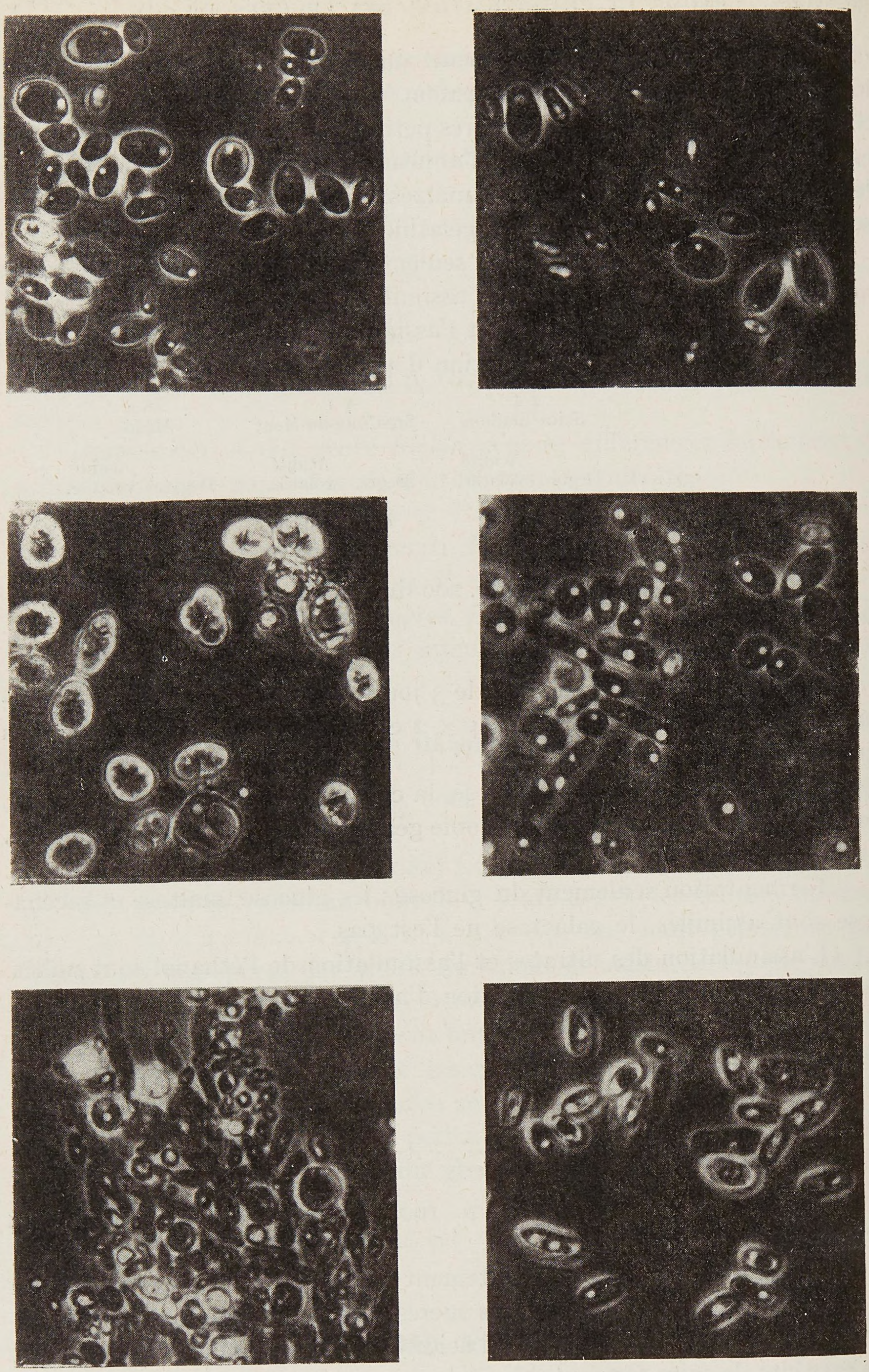
	31 XII Premières Côtes de Bordeaux	
	Degré.	Acidité volatile.
Air	10°3	0,40
Abri de l'air	8°4	0,55

Fermentation sélective : 85 p. 100 du glucose pour 50 p. 100 du fructose.

K. africana se distingue nettement de *K. apiculata* par la grosseur des cellules, par l'assimilation des sucres, par le pouvoir alcoogène beaucoup plus élevé et la formation d'acidité volatile plus faible et enfin par la capacité de faire fermenter le glucose beaucoup mieux que le fructose.

Kloeckera jensenii (KLÖCKER) JANKE.

Sur le moût de raisin, au bout de 6 jours à 25°, les cellules ont des formes variées : apiculées, et elliptiques 10 × 5 à 3 × 2 μ et 8 × 6 μ.



Photographies de cultures sur milieux solides G = 1 000.

De haut en bas et par colonnes : *Brettanomyces vini*, *Sacch. ellipsoïdeus*, *Pichia membranaefaciens*. — *Brettanomyces schanderlii*, *Hansenula anomala*, *Pichia fermentans*.

Le liquide au bout de 6 jours est à peu près limpide. Cette souche a été isolée à partir d'une petite colonie prélevée sur le moût au début de la fermentation. Nous avons observé la fermentation des glucose, saccharose et raffinose pour un tiers, le maltose et le galactose n'étant pas fermentés. Nous n'avons pu poursuivre l'étude de cette levure, car la souche a été perdue.

Torulopsis bacillaris (KROEMER et KRUMBHOLZ) LODDER.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont elliptiques, un peu allongées, groupées par le bourgeonnement multipolaire autour de la cellule mère. 6 × 3 à 3 × 2 μ. Sur malt gélosé, les cellules sont très petites, le rapport longueur/largeur est voisin de 2. Sur moût de raisin, le liquide est limpide, la fermentation laisse de légères traces sur le tube. Sur moût gélatiné, les colonies sont en général petites et mates, en relief, en piton rose, ou dentelées ou blanches ou brillantes. Les colonies géantes sur moût de raisin gélatiné sont petites et minces, plus ou moins brunes et légèrement enfoncées dans la gélatine. Elles sont très caractéristiques.

Fermentation et assimilation des glucose, saccharose et raffinose pour un tiers ; les maltose et galactose ne fermentent pas et ne sont pas assimilés.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	5 III Premières Côtes		13 N Côtes de Montravel		14 J Graves	
	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.
Air..........	11°7	0,55	11°8	0,27	11°2	0.52
Abri de l'air..	7°8	0,64	8°0	0,37	7°7	0,49

Fermentation sélective : 5 p. 100 du glucose pour 50 p. 100 du fructose.

Torulopsis famata (HARRISON) LODDER et K-VAN RIJ.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont à peu près rondes 6 × 6 μ, 5 × 5 μ, 4 × 3 μ. Certaines ont un globule assez gros. Le liquide est limpide, un anneau blanc jaunâtre est formé en surface, le dépôt est marron. Sur malt gélosé, la culture est très légèrement rosée, très brillante. Les colonies géantes sur moût gélatiné sont rosées, mates. Parfois elles liquéfient la gélatine.

Fermentation du glucose seulement ; les glucose, maltose, saccharose et galactose sont assimilés. Un anneau et un dépôt de coloration rose sont formés sur les tubes d'assimilation.

L'assimilation des nitrates est nulle.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	II Médoc	
	Degré.	Acidité volatile.
	—	—
Air		0,12
Abri de l'air	2°1	0,09

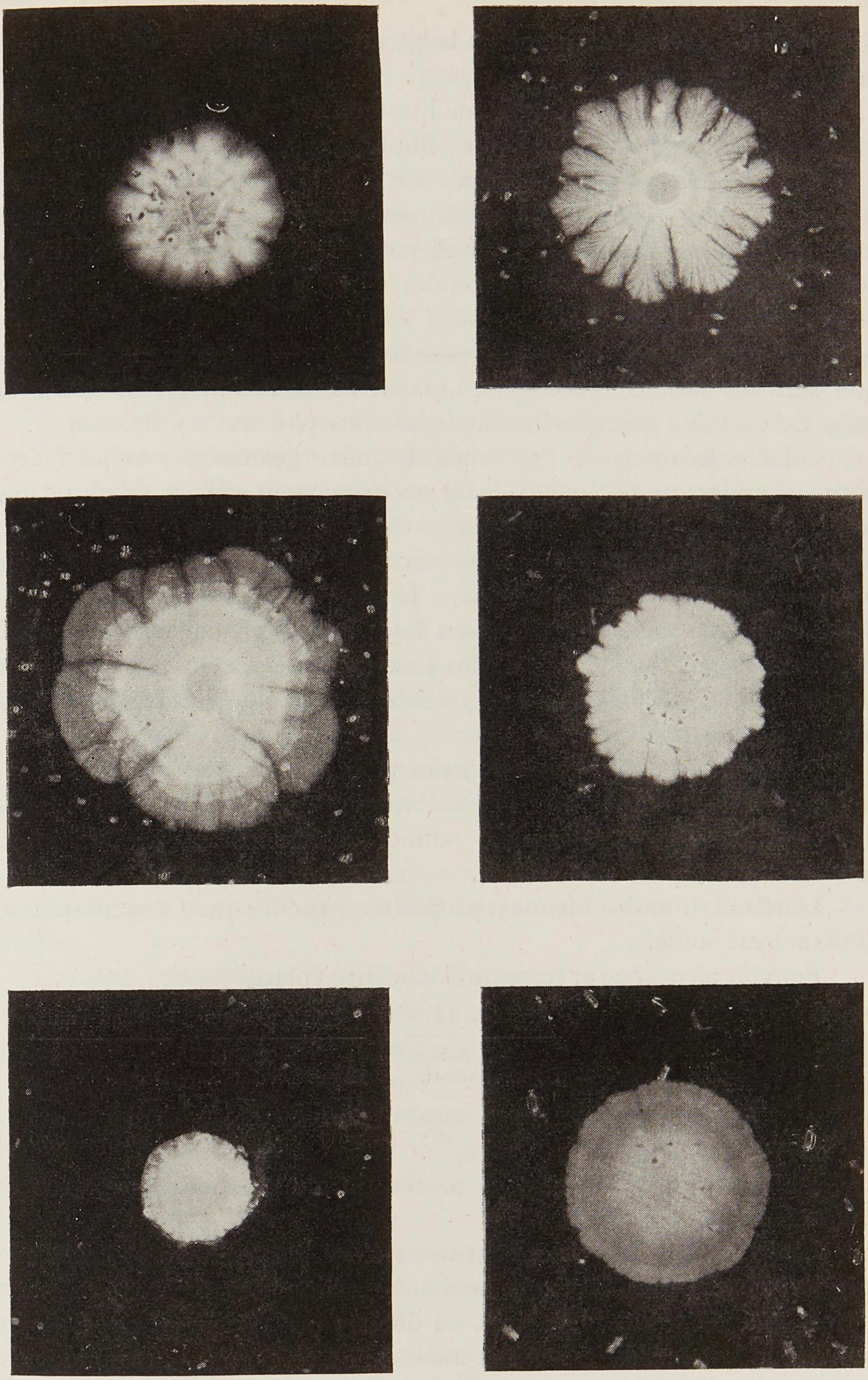
Brettanomyces vini (nouvelle espèce).

Nous avons isolé quatre souches de levures que nous avons identifiées comme appartenant au genre *Brettanomyces*. Avec les deux souches que nous avons conservées, nous avons conduit une étude plus approfondie que pour les autres espèces et qui a fait l'objet d'une publication (83). Jusqu'à maintenant, en effet, les souches de *Brettanomyces* avaient été surtout isolées sur des bières (CLAUSSEN, KUFFERATH et Van LAER, CUSTERS). Cependant SCHANDERL a rencontré plusieurs fois de telles levures dans des vins mousseux (98). AGOSTINI dans un voile de vin acétifié (1) BARRET, BIDAN et ANDRÉ, au cours d'isolements sur des vins, jaunes du Jura altérés, ont trouvé des levures appartenant au genre *Brettanomyces* (4). Enfin, tout récemment, GALZY et RIOUX ont reconnu quelques souches de *Brettanomyces* parmi les levures formant des voiles de fleur à la surface des vins (44).

Dans l'étude précitée, nous avons comparé les souches isolées avec des souches de divers *Brettanomyces* : *Br. claussenii* et *Br. bruxellensis*, provenant du C. B. S. de Delft ; *Br. lambicus*, *Br. anomalus* et deux espèces de *Brettanomyces* isolées de vins mousseux, que nous devons au Pr SCHANDERL de Geisenheim ; enfin avec deux souches de vins d'Arbois, que nous devons à la Station de Technologie de Versailles.

DESCRIPTION. — Sur moût de raisin, au bout de 3 jours, le liquide est très légèrement trouble, les cellules sont elliptiques, un peu allongées 6×3, $5 \times 3\ \mu$ ou 8×3 à $5 \times 3\ \mu$ suivant les souches. Au bout de 6 jours, le liquide est trouble. Un dépôt est formé au fond du tube. Les cellules sont un peu plus grosses 8×4 à $5 \times 3\ \mu$ ou 10×3 à $5 \times 3\ \mu$. Au bout de 30 jours, les cellules ont un aspect à peu près identique : elles sont isolées, ou groupées par deux, ou en petites chaînes ayant jusqu'à 5 éléments. Le liquide est limpide ; des dépôts sont formés sur le fond et les parois du tube. Une souche forme des anneaux importants, tandis que l'autre n'en forme pas ou peu.

Sur moût de bière, l'aspect des cellules au cours du développement est sensiblement le même : d'une façon générale, elles sont un peu plus arrondies 8×6 à $5 \times 3\ \mu$ ou 10×5 à $6 \times 3\ \mu$. Entre le troisième et le sixième jour on note l'apparition de globules ronds dans les cellules qui restent isolées, mais plus souvent groupées par deux ou en courtes chaînes. On peut noter au bout de 3 jours un léger voile mat, puis la formation



Photographies de colonies géantes sur moût gélatiné.

De haut en bas et par colonnes : *Sacch. ellipsoideus, Sacch. carlsbergensis Brettanomyces vini.* — *Sacch. ellipsoïdeus, Sacch. elegans, Pichia membranaefaciens.*

incomplète d'un anneau blanc ou beige au-dessus du liquide qui devient peu à peu limpide.

Sur moût de bière gélosé, au bout de 4 jours, la culture blanche, brillante, est formée de cellules elliptiques allongées 7 × 4, 5 × 3, 4 × 2 µ et de cellules très longues 12 × 4 µ ou même 20 × 3 µ. Au bout de 7 jours, les cellules elliptiques contiennent un granule et les longues cellules forment des chaînes ramifiées. Au bout de 31 jours, les cellules sont plutôt grosses et rondes 9 × 7 µ à 4 × 3 µ ou 12 × 5 µ avec beaucoup de cellules 8 × 7 à 5 × 3 µ.

Sur milieu de Gorodkowa, les cellules sont en moyenne plus petites que dans les milieux précédents. Les cultures sont minces, blanches, formées de colonies juxtaposées. Nous n'avons pas observé de spores.

Colonies géantes. — Sur moût de raisin gélatiné : colonies beiges, petites, rondes, mates ; centre plat ou légèrement creusé, bordure finement rayonnée, festons très petits. — Sur moût de bière gélosé : colonies blanches, brillantes, amorphes. — Sur moût de raisin gélosé : colonies blanches ou beige rosé, rondes sans festons, amorphes, brillantes.

Les deux souches cultivées en boîtes de Pétri sur moût gélatiné, liquéfient la gélatine. L'une d'elles ensemencée en profondeur, sur moût gélatiné, a laissé le milieu encore solide alors que l'autre avait déjà liquéfié la gélatine.

Fermentation et assimilation des glucose, maltose, saccharose, galactose. La fermentation et l'assimilation du galactose sont plus lentes que celles des autres sucres. Le raffinose et le lactose ne fermentent pas.

L'assimilation des nitrates est positive, tandis que l'assimilation de l'éthanol est nulle.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	Premières Côtes		Premières Côtes		Saint-Emilion	
	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.
Air	13°1	3,54	13°2	2,94	13°1	0,86
Abri de l'air	12°9	2,17	9°9	3,74	12°6	0,76

Fermentation sélective : 75 p. 100 du glucose pour 50 p. 100 du fructose.

Les pouvoirs alcoogènes sont assez élevés, les acidités volatiles sont très fortes, sauf pour la souche de Saint-Emilion. Les départs en fermentation étaient très lents, surtout au début ; peu à peu, ils ont été plus rapides, la levure s'est adaptée, semble-t-il, à fermenter plus rapidement le moût de raisin.

Les souches que nous avons isolées sont très voisines des deux souches d'Arbois et d'une des souches de *Brettanomyces* de Geisenheim. Elles n'appartiennent pas à l'espèce *bruxellensis* qui ne fait fermenter que le

glucose, le maltose et le saccharose et n'assimile pas le galactose, ni les nitrates. Elles se rapprocheraient davantage de *Br. claussenii*, mais cette espèce fait fermenter le lactose.

BARRET et ses collaborateurs (4) ont nommé cette levure *Br. bruxellensis* var. *vini* ; en réalité il y a entre *Br. bruxellensis* et cette levure beaucoup plus qu'une différence de variété. Ce sont des espèces nettement distinctes et pour exprimer cette différence, nous appelons cette espèce nouvelle, *Brettanomyces vini*.

Par ailleurs une autre souche de Geisenheim n'a rien de commun avec les précédentes et nous avons proposé de nommer cette nouvelle espèce, *Brettanomyces schanderlii* (83).

Depuis que ce travail a été fait, nous avons été amenés à identifier 3 souches provenant de la refermentation d'un vin clairet de Bordeaux, avec la souche *Brettanomyces schanderlii* : elles ont la même propriété de ne faire fermenter que le glucose et le galactose et présentent la même courbe de fermentation. Nous en traiterons en détail dans le chapitre VII.

Rhodotorula mucilaginosa HARRISON.

Sur moût de raisin, au bout de 10 jours à 25°, il n'y a pas de fermentation, les cellules sont très clairsemées, petites et rondes 6 × 6 à 4 × 3 μ. Un anneau rose se forme. Sur malt gélosé, la culture humide est très brillante, lisse, de couleur rose vif ou orangé. Sur moût gélatiné, la colonie géante est petite, brillante, ronde, déprimée au centre avec un bourrelet au bord.

Aucune fermentation des sucres n'est observée. Les glucose, maltose, saccharose, galactose sont assimilés. On ne constate pas d'assimilation des nitrates.

Candida pulcherrima (LINDNER) WINDISCH.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25° les cellules sont elliptiques, de grosseur moyenne, assez régulières, non transparentes. 8×7 μ, 5 × 4 μ, 4 × 3 μ. Au bout de 21 jours, les cellules ont 3 × 2, 4 × 3 μ. Sur malt gélosé, on n'observe pas de spores, mais des cellules très petites ou bien, beaucoup plus grosses avec un granule brillant (« pulcherrima »). Sur moût de raisin, le liquide de culture est limpide ; parfois, il y a formation d'un anneau.

Sur malt gélosé, la culture forme une pâte lisse, humide, de couleur crème. La colonie géante sur moût gélatiné est assez grosse, blanche. Elle liquéfie un peu la gélatine.

Fermentation du glucose seulement. Les maltose, saccharose et galactose sont assimilés.

L'assimilation des nitrates est nulle. On note un faible développement sur l'éthanol.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	II Saint-Emilion	
	Degré.	Acidité volatile.
	—	—
Air	—	0,06
Abri de l'air	2°4	0,06

Candida mycoderma (REESS) LODDER et K-VAN RIJ.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont elliptiques ou allongées en bâtonnets 10 × 2 à 6 × 2 μ. Le liquide est trouble, un voile blanc, remontant, plissé est formé, parfois il est ténu ; un volumineux dépôt se rassemble au fond du tube. Sur malt gélosé, la culture peut être lisse, assez brillante, remontant en arborescences, ou mate et granulée, blanche ou brune, ou blanc jaunâtre, mate et brillante suivant les endroits. On n'observe pas de spores. Sur moût gélatiné, la colonie est petite, blanche, mate. La colonie géante sur moût gélatiné est très étendue et liquéfie la gélatine. Elle peut être mate, de couleur normale, peu découpée, mais avec des secteurs vermiculés.

Aucun pouvoir fermentatif. Seul le glucose est assimilé. L'assimilation des nitrates est nulle et on constate un développement net sur milieu à l'éthanol.

(A suivre).

MICROFLORE DES FARINES FRANÇAISES [1] COMPOSITION ET ÉVOLUTION

PAR

M^me^ **J. POISSON et A. GUILBOT**

Laboratoire de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales, Paris

PLAN DU MÉMOIRE

Introduction

I. — Méthodes de numération de la microflore des farines.

A. — Travaux antérieurs.

1° Modalités de préparation de l'échantillon à examiner.

2° Milieu de culture optimum pour la numération :

a) des bactéries,

b) des moisissures et levures.

B. — Détermination des conditions optima de numération.

1° Comparaison des techniques de dispersion.

2° Comparaison des divers milieux de cultures pour la numération :

a) des moisissures et levures,

b) des germes totaux.

C. — Mode opératoire adopté.

II. — Composition de la microflore.

A. — Travaux antérieurs.

1° Moisissures.

2° Levures.

3° Bactéries.

B. — Matériel utilisé et résultats obtenus.

1° Moisissures.

2° Levures.

3° Bactéries.

C. — Discussion.

III. — Influence de la température et de la tension de vapeur d'eau relative sur le développement des microorganismes dans les farines.

A. — Travaux antérieurs.

B. — Matériel utilisé et mode opératoire.

C. — Résultats obtenus.

D. — Discussion.

1° Bactéries.

2° Levures et Moisissures.

3° Incidences technologiques.

IV. — Résumé et conclusions.

(1) Travail effectué en liaison avec les laboratoires de l'École française de Meunerie et avec la collaboration technique de M^lle^ L. Tallineau.

INTRODUCTION

Moisissures, levures et bactéries se trouvent couramment dans les blés et les produits de mouture. Par suite des altérations dues à l'activité de cette microflore, on estime que près de 5 p. 100 des céréales récoltées dans le monde, disparaissent chaque année du circuit alimentaire (1).

Ainsi qu'en témoigne la mise au point récente de SEMENUIK et ZELENY (2 - 3), les recherches entreprises sur la microflore des produits céréaliers sont nombreuses mais assez disparates et concernent surtout les céréales en grains.

Dans les farines également, si les conditions de température et d'humidité deviennent favorables, les microorganismes présents peuvent se multiplier au cours du stockage et compromettre l'opération.

Certes, sous notre climat, avec les farines commerciales ayant une teneur en eau maximum de 15-16 p. 100, on ne constate pratiquement pas d'accidents de conservation pendant les 3 à 4 semaines qui séparent, en général, la mise en mouture d'un blé de l'utilisation de sa farine.

Il n'en est vraisemblablement plus de même, si on est amené à constituer des réserves de farine pour des durées de stockage indéterminées, dans des conditions mal définies. En outre, les farines d'exportation sont susceptibles de supporter des climats chauds et humides particulièrement favorables au développement des microorganismes.

Par leur métabolisme, les microorganismes modifient la composition de la farine (4 - 5) et ses qualités technologiques. Ils influent ainsi sur la texture, la qualité et la valeur nutritive du pain (4 - 6). Ils provoquent dans la majorité des cas le développement de mauvaises odeurs (moisi), de goûts désagréables, et peuvent parfois élaborer des toxines ou être responsables d'accidents allergiques (7 — 8). Cependant tous les éléments de la microflore n'ont peut-être pas une action néfaste, certains sont susceptibles de participer au processus de maturation des farines qui améliore leur valeur boulangère.

Il y a donc intérêt à connaître la microflore de la farine, ses conditions de développement, son action sur celle-ci et les incidences technologiques qui en résultent.

C'est pourquoi nous nous sommes proposés, dans une étude préliminaire, de dénombrer la microflore de farines françaises, plus particulièrement la microflore fongique, d'en étudier qualitativement et quantitativement l'évolution au cours du stockage en fonction de l'humidité et de la température.

I. — MÉTHODES DE NUMÉRATION DE LA MICROFLORE DES FARINES

A. — Travaux antérieurs.

La méthode de numération sur milieu nutritif en boîtes de Pétri a été adoptée dans la plupart des recherches antérieures sur les produits céréaliers.

Les variations dans les modes opératoires portent :

1° Sur les modalités de préparation de l'échantillon à examiner.

Il est nécessaire de désagréger le produit à analyser pour avoir une bonne libération des germes microbiens.

Christensen (9) agite, pendant 2 minutes, 5 g de farine mélangée à 10 g de sable de quartz stérile dans 47 ml de solution à 0,5 p. 100 de ClNa. James et Smith (10) remplacent le sable de quartz par du gravier fin et se servent d'eau stérile pour la dilution, ne jugeant pas nécessaire la présence de ClNa, celui-ci n'étant pas utilisé habituellement pour l'examen bactériologique des sols et du lait.

2° Sur le choix d'un milieu de culture optimum.

a) Pour la numération des bactéries, les milieux les plus fréquemment utilisés sont : — le milieu de Kent Jones et Amos (11) à base de « gélose nutritive » ;

— le milieu synthétique de Barton-Wright (4) destiné à éviter les variations de composition des milieux riches naturels ;

— les milieux de James et Smith (10) permettant de dénombrer les producteurs d'acide, les spores thermophiles, les aérobies et anaérobies ;

— les milieux de Keilling (12) à base de produits laitiers.

b) Pour la numération des moisissures et des levures, la croissance des bactéries est inhibée soit en abaissant le pH (Barton Wright, James-Smith, Keilling), soit en ajoutant du chlorure de sodium (Christensen).

B. — Détermination des conditions optima de numération.

Afin de fixer un mode opératoire optimum, nous avons procédé :

1° A la comparaison des techniques de dispersion.

1 g de farine mis en suspension dans 20 ml d'eau ordinaire stérile en présence, soit de 2 g de sable de quartz sec et stérile, soit de 8 g de billes

de verre (de 3 mm de diamètre) est agité sur un agitateur à va-et-vient, à raison d'un mouvement par seconde ; à une vitesse supérieure, une lésion des microorganismes serait à craindre.

Pour un temps d'agitation donné, les résultats obtenus dans les deux cas sont sensiblement les mêmes (soit respectivement de 44, 45, 47, 49 et de 45, 47, 48, 50 colonies recensées par boîte de Pétri) ; c'est pourquoi nous avons choisi l'emploi des billes de verre, la suspension ainsi obtenue étant plus facile à pipeter.

La durée d'agitation optimum a été déterminée : le nombre de colonies retrouvées sur boîte de Pétri croît (de 98 à 125) pendant les 6 premières minutes pour devenir stationnaire après 10 à 15 minutes (141 — 138) et diminuer légèrement ensuite (117 après 20 minutes).

2° **A la comparaison des divers milieux antérieurement préconisés et de milieux nouveaux à base de malt** [1] **et de lait en poudre**, produits peu couteux et d'une utilisation facile.

a) Numération des moisissures et levures.

Les résultats obtenus après une durée d'incubation de 6 jours à 25°C sont indiqués dans le tableau I.

Sur les milieux 1 — 3 — 4 — 5 — 6, on trouve pratiquement le même nombre de colonies. Parmi ceux-ci le 4 est le plus intéressant : tout aussi sélectif que le milieu 1 de Christensen, il permet une lecture plus facile sur boîte de Pétri, sans emploi de loupe ou de microscope : les colonies étant plus grosses et de formes mieux définies grâce à sa plus faible teneur en chlorure de sodium.

Dans les milieux 5 et 6, le pH inférieur à 4 provoque une précipitation dans le malt au moment de la stérilisation.

Les milieux 2 (de Barton-Wright) et 9 — 10 à base de farine ayant subi un début de digestion à l'amylase, fournissent des résultats sensiblement inférieurs.

Les milieux 7 — 8 à base de lait sec donnent également, pour les moisissures rencontrées sur la farine, des résultats inférieurs aux milieux maltés.

b) Numération des germes totaux (bactéries + levures + moisissures).

Un milieu gélosé à base de lait digéré à la papaïne et de farine digérée à l'amylase a été comparé avec du malt gélosé ; la durée d'incubation des boîtes de Pétri étant de 3 jours à 30°C (tableau II).

Le milieu au malt s'est révélé le meilleur, il est en outre d'une préparation rapide et facile.

(1) Le malt utilisé est le Cristomalt Jacquemaire en poudre.

TABLEAU I

Milieu de culture		pH	Nombre de microorganismes par gramme de farine
N°	Composition		
1	Milieu Christensen (9) Extrait de malt 20 g ClNa 75 g Gélose 20 g Eau distillée q. s. pour 1 000 ml	5	6 200
2	BARTON-WRIGHT (4) PO_4HK_2 0,5 g Asparagine 1 g Glycocolle 10 g Eau q. s. pour 1 000 ml	4,8	2 000
3	Malt 40 g ClNa 40 g Eau du robinet q. s. pour 1 000 ml. gélosé au moment de l'emploi ([1])	4,5	6 900
4	Malt 40 g ClNa 1 g Eau du robinet q. s. pour 1 000 ml. gélosé	4	7 500
5	Malt 40 g Eau du robinet q. s. pour 1 000 ml. gélosé	3,5	6 000
6	Malt 40 g dans extrait de son (préparé par hydrolyse acide) (200 g de son pour 1 litre de milieu) gélosé	4	7 000
7	Lait (dilué au 1/3 digéré à la papaïne) gélosé	4	5 400
8	»	3,5	4 400
9	Extrait de farine digéré à l'amylase Farine 200 g Eau 300 ml Activase 3 g gélosé	4	4 000
10	Mélange des 2 milieux précédents en parties égales gélosé	4	4 100

([1]) Les milieux acides 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 sont gélosés juste au moment de l'emploi avec une gélose à 32 g par litre, qui après fusion, est mélangée volume à volume avec le milieu dans la boîte de pétri.

TABLEAU II

N°	Milieu de culture composition	Nombre de colonies dénombrées par gramme de farines		
		N° 1	N° 2	N° 3
A	Lait au 1/3 digéré à la papaïne 500 ml + farine 50 g dans 500 ml d'eau digérée à l'amylase + gélose 18 g (12)	147 000	29 500	17 500
B	Malt 20 g Gélose 18 g Eau q. s. pour 1 000 ml	166 000	33 100	18 500

c) Mode opératoire adopté :

Pour toutes les analyses, le processus suivant a donc été adopté :

1 g de la farine à examiner, pesé exactement et aseptiquement, est versé dans un ballon de 500 ml contenant exactement 20 ml d'eau stérile et 8 g de billes de verre de 3 mm de diamètre. Le ballon est placé sur un agitateur à va-et-vient. (Agitation 10 minutes — 1 mouvement par seconde.)

La numération est faite à partir de cette suspension. (Les dilutions sont poussées de manière à obtenir une cinquantaine de colonies environ par boîte de Pétri).

Le milieu 4 est choisi pour le dénombrement des moisissures, le milieu B pour celui des germes totaux, les durées d'incubation étant respectivement de 6 jours à 25°C et de 3 jours à 30°C.

II. — COMPOSITION DE LA MICROFLORE

A. — Travaux antérieurs.

Les résultats obtenus par d'autres auteurs sont incomplets pour un même type de farine ; en outre, il existe peu de renseignements concernant les farines françaises.

1° Moisissures.

Sur 20 farines à 75 p. 100 de taux d'extraction, provenant de moulins d'importance différente, disséminés sur tout le territoire belge, Soenen et Pinguair (13) ont trouvé des chiffres allant de 152 à 19 982 germes par gramme.

Barton-Wright (4) pour des farines anglaises fraîchement moulues (à 75 p. 100) signalent de 1 000 à 2 000 germes par gramme. Christensen (14) sur des farines américaines de provenances et de taux d'extraction différents, dénombre de 225 à 5 180 colonies par gramme.

James et Smith (10) au Canada en comptent 1 270 à 3 960. Holtman (15) donne une moyenne de 1 800 germes par gramme de farine fraîche.

Quelques auteurs seulement ont déterminé les genres de moisissures des farines.

D'après Christensen (14) 90 p. 100 des moisissures sont des *Aspergillus* (*Aspergillus glaucus* 75 p. 100 et *Aspergillus candidus* 15 p. 100 ; les 10 p. 100 restant sont surtout composés de *Penicillium*).

Par contre Barton-Wright (4) trouve que dans certaines farines anglaises 90 p. 100 des moisissures sont des *Penicillium*.

2° Levures et pseudo-levures.

BARTON-WRIGHT et HOLLIGER (4 — 16) observent leur présence ; JAMES et SMITH (10), sur des farines canadiennes, indiquent des chiffres allant de 12 à 218 par g de farine ; ils ne trouvent des levures que d'une façon sporadique sans relation avec le nombre des autres microorganismes ou les caractéristiques de la farine.

3° Bactéries.

En Belgique, SOENEN et PINGUAIR (13) signalent de 810 à 52 000 bactéries par gramme de farine, KENT-JONES (11) dans les farines anglaises à 70 p. 100 de taux d'extraction n'en trouve que 5 000 à 10 000 et JAMES et SMITH (10) 2 750 à 19 500.

Par contre GUSTAFSON et PARFITT (17) trouvent des chiffres élevés allant de 9 000 à 380 000.

De nombreux chercheurs ont identifié un grand nombre d'espèces appartenant à l'ordre des Eubactériales, plus spécialement aux familles des Pseudomonadaceae, Micrococcaceae, Lactobacteriaceae, Achromobacteriaceae, Enterobacteriaceae, Bacteriaceae, Bacilliaceae, enfin la présence d'Actinomycetaceae a été signalée.

SEMENIUK (2) conclut donc qu'il n'existe pas une microflore spécifique des farines, les microorganismes qui la composent étant ceux que l'on trouve dans les sols, dans l'air, sur les plantes et sur les animaux (vivants ou morts).

B. — Matériel utilisé et résultats obtenus.

Les farines examinées ont été obtenues à partir de blés humides de l'année 1954-55 dans différents moulins de la région parisienne d'une capacité de 3 000 à 10 000 qx.

Elles sont âgées de moins de 2 semaines et leur teneur en eau est voisine de 15 p. 100. Les taux d'extraction sont de Ps-2 et Ps-5 soit de l'ordre de 70 à 76 p. 100.

1° Moisissures.

Les chiffres obtenus s'échelonnent de 3 000 à 21 000 par g de farine, sans présenter de différence significative entre les 2 catégories de farine.

Les genres de moisissures sont très divers, mais la même flore, répartie de façon sensiblement identique, se retrouve sur les différentes farines examinées. Elle se compose :

a) de 75 p. 100 d'*Aspergillus*, dont au moins la moitié est constituée

d'*Aspergillus candidus*, le reste comprenant surtout des *Aspergillus glaucus*, flavus, ochraceus et versicolor.

b) de 15 à 20 p. 100 de *Penicillium* variés sp.

c) d'une grande variété d'autres Fungi imperfecti : en particulier *Cladosporium*, *Hormodendrum*, *Alternaria*.

d) de Mucorinées (dont *Mucor racemosus* et *Mucor italiania ?*)

2° Levures et Pseudo-levures.

Elles sont présentes dans toutes les farines examinées, mais leur nombre n'excède pas 300 par g. Ces levures n'ont pas été identifiées. Cependant nous avons noté la présence constante d'une Rhodotorula et d'une Monilia.

3° Bactéries.

Nous avons trouvé de 10 000 à 84 000 bactéries par gramme de farine. Les bactéries aérobies sont les plus nombreuses. Les bactéries thermophiles sont assez rares. Il n'y a pas eu d'identification systématique, néanmoins signalons la présence constante de P. fluorescens, de E. coli, d'un petit nombre de bactéries sporulées (B. megaterium et B. subtilis) et de nombreux coccobacilles formant de grosses colonies jaunes. Quelques *Actinomyces* sont également présents.

C. — Discussion.

Le nombre de bactéries est plus élevé que celui des moisissures, mais on ne trouve pas de rapport constant entre eux (tableau III).

Les rapports nombre de moisissures/nombre de bactéries varient de 0,04 à 0,6 ; ces chiffres sont à rapprocher de ceux trouvés par Soenen et Pinguair (13) et compris entre 0,004 et 1,0.

Pour les moisissures, les chiffres obtenus sont généralement du même ordre de grandeur que ceux de Soenen et Pinguair. Ils sont plus élevés que ceux de Christensen (14) et surtout que ceux de Holtman et James (10 — 15). Ceux indiqués par Barton-Wright (18) sont aussi systématiquement plus faibles que les nôtres, sans doute parce que la numération des microorganismes a été faite dans ce cas, sur des milieux synthétiques incomplets.

Les résultats concernant les levures sont voisins de ceux rapportés par James et Smith (10). Quant aux nombres de bactéries, ils se situent dans la même gamme que ceux indiqués par Soenen et Pinguair (13). Par contre, ils sont un peu plus élevés que ceux de Kent-Jones et James et Smith (11 — 10).

Ainsi le nombre de microorganismes des farines fraîches reste du

même ordre de grandeur quelle que soit la provenance de celles-ci (Angleterre, Allemagne, Belgique, U. S. A., Canada). Cependant, il semble que les espèces représentées dans cette microflore soient relativement constantes et spécifiques, malgré leurs origines très diverses, signalées par SEMENIUK (2) par suite d'une sélection se faisant dans la farine (milieu à faible teneur en eau).

TABLEAU III

Provenance des farines	Taux d'extraction	Nombre de microorganismes par gramme de farine		rapport : nombre de moisissures / nombre de bactéries	Teneur en eau de la farine
		Bactéries	Moisissures		
A	Ps — 5		8 400		13,0
A	Ps — 2		7 600		12,0
B	Ps — 2	33 000	21 000	0,63	
B	Ps — 2		10 600		13,0
B	Ps — 2	44 500	7 500	0,17	
B	Ps — 2	14 300	3 800	0,26	
B	Ps — 2	16 100	6 000	0,6	15,0
B	Ps — 2	18 000	2 000	0,11	
B	Ps — 2	23 000	920	0,04	14,55
C	voisin de Ps — 5		3 200		12,9
C	Ps — 5	33 400	4 600	0,14	12,6
C	Ps — 2	15 600	7 100	0,45	
C	Ps — 2		4 500		13,6

Au point de vue qualitatif pour les moisissures, nous avons trouvé sensiblement la même répartition que CHRISTENSEN (14) ; quant aux bactéries, les résultats sont trop dispersés et fragmentaires pour que nous puissions faire des comparaisons valables.

Nous avons constaté une grande similitude, au point de vue qualitatif, entre la microflore des farines et celle des blés dont elles proviennent avant la mise en mouture ; cependant, ainsi que l'indique CHRISTENSEN (14) il ne faut pas en conclure que la microflore des farines provient uniquement de celle du blé ; le nombre de germes totaux trouvés dans les échantillons de blé avant mouture est souvent inférieur à celui des farines

TABLEAU IV

	Nombre de germes fongiques					
Blé (1)	130	130	650	640	220	80
Farine correspondante 70 à 76 %....	4 500	3 200	7 500	10 600	7 600	8 400
Origine de la farine......	A	A	B	B	C	C

(1) Le blé est broyé au moulin turc. L'examen bactériologique de la mouture est fait suivant le processus adopté ci-dessus pour la farine.

correspondantes (13 700 à 22 200 ; 80 000 à 123 000) et le rapport du nombre de moisissures du blé au nombre de moisissures de la farine varie de 0,5 à 0,01 (tableau IV). Il y a donc pollution de la farine au cours des transformations technologiques subies par le blé. Peut-être y-a-t-il contamination des produits finis par les dépôts de farine stagnant dans les vis et recoins des appareils.

III. — INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE ET DE LA TENSION DE VAPEUR D'EAU RELATIVE SUR LE DÉVELOPPEMENT DES MICROORGANISMES DANS LES FARINES

A. — Travaux antérieurs.

La température et l'humidité conditionnent la conservation des farines au cours du stockage, en particulier par leur influence sur le développement des microorganismes.

Kent-Jones et Amos (11) constatent que la population bactérienne décroît au cours du stockage dans les conditions atmosphériques normales. Ils estiment qu'un abaissement de la tension de vapeur d'eau relative provoque une diminution plus rapide des bactéries qu'un abaissement de température.

Barton-Wright (4) confirme cette évolution des bactéries et trouve en outre que celles-ci disparaissent d'autant plus vite que la farine est plus humide, ce phénomène pouvant être dû à une diminution du pH du milieu. Il conclut que des accidents d'ordre bactérien ne risquent pas de se produire au cours du stockage de la farine.

Barton-Wright et Tomkins (18) étudient l'influence de l'humidité sur l'évolution de la microflore fongique à des températures égales ou inférieures à 20°C pour des durées de stockage allant jusqu'à 250 jours. Ils constatent que, pour une température déterminée, le temps d'apparition des moisissures dans une farine est fonction de l'humidité relative et que pour une humidité relative déterminée, il est fonction de la température. Ils indiquent qu'en pratique, le développement des moisissures risque de compromettre le stockage des farines dont la teneur en eau est égale ou supérieure à 16 p. 100.

Dans le même ordre d'idées, A. Schulz (19) recherche le temps nécessaire à la formation de « pelotes » dans la farine pour des tensions de vapeur d'eau relatives de 75 à 95 p. 100, à une température de 37°C.

Les documents concernant ce problème sont donc peu nombreux et fragmentaires. Or il est intéressant de connaître l'évolution de la population microbienne des farines aussi bien pour les températures et les tensions de vapeur d'eau relatives de nos climats que pour celles des pays

subtropicaux et tropicaux. C'est pourquoi nous avons repris sur des farines françaises les travaux de Barton-Wright et examiné de plus, le comportement de ces farines à des températures allant de 20°C à 45°C.

B. — Matériel et mode opératoire.

Les farines utilisées proviennent de trois moulins de la région parisienne. Ce sont des farines commerciales aux taux d'extraction Ps-2 et Ps-5 (soit de 70 à 76 p. 100) ayant des teneurs en eau de 13,5 et 15,5 p. 100 (du poids humide).

Tableau V

Tension de vapeur d'eau relative en p. 100	Teneur en eau de la farine (en % de la substance humide)				
	0 - 4°C	13°C	25°C	35°C	45°C
70					13,5
75	14,8	15,9	15,5	14,8	13,6
78	16,8	16,7	16,5	15,5	14,3
83	18,2	18	17,3	16,7	15,5
89	19,2	18,5	18,4	18,2	17,5
92	21,5	21	20,9	21,3	23

Tableau VI

Temps de latence

Tension de vapeur d'eau relative en p. 100	0 — 4° C	13° C	25° C	35° C	45° C
70	Plus de 6 mois				
75	Plus de 6 mois				
78	Plus de 6 mois		4 semaines	Plus de 6 mois	
83	Plus de 6 mois		3 semaines	2 semaines	5 semaines
89	Plus de 6 mois		2 semaines	moins d'une semaine	3 semaines
92	Plus de 6 mois	1 semaine	moins d'une semaine	moins d'une semaine	moins d'une semaine
100	7 semaines				

L'altération des farines, conservées sous de grands volumes et s'humidifiant progressivement, commence par la couche périphérique et ne gagne que lentement l'intérieur du sac. Afin de ne pas masquer l'intensité du phénomène en mélangeant les couches périphériques altérées aux couches profondes encore intactes, nous avons étudié simultanément l'influence de la température et de la tension de vapeur d'eau relative de l'air sur le développement de la microflore de farines étalées en couche mince.

Réalisation des conditions de températures et d'humidités relatives constantes : la farine est étalée en couches d'une épaisseur d'environ 0,5 cm dans des petits cristallisoirs déposés à l'intérieur de bocaux étanches en présence des solutions d'acide sulfurique de différents titres, permettant d'obtenir les tensions de vapeur relatives désirées, soit : 70, 75, 78, 83, 89, 92 p. 100. Ces bocaux sont placés dans des enceintes maintenues à 0°C, 4°C, 13°C, 25°C, 35°C, 45°C.

En raison de la capacité du bocal par rapport au volume de la farine et du fait que l'atmosphère de l'enceinte était renouvelée à chaque ouverture du récipient, les conditions expérimentales réalisées restent assez voisines de l'aérobiose.

Prélèvement et dosages : Chaque semaine, après homogénéisation de la farine avec une spatule stérile, on prélève aseptiquement 1 g de farine pour l'analyse bactériologique, et 200 mg pour chaque dosage d'eau.

L'analyse bactériologique est réalisée suivant le processus déjà décrit. Le dosage de l'eau de la farine est réalisé par dessiccation sous vide vers 50°C en présence de P_2O_5 (20).

C. — **Résultats obtenus.**

Teneur en eau de la farine :

Le tableau V donne la teneur en eau de la farine p. 100 de la substance humide en fonction de la température et de la tension de vapeur d'eau relative.

Dès la fin de la première semaine, la plupart des farines sont à l'équilibre avec l'humidité relative de l'enceinte. Cependant, pour les farines maintenues à 92 p. 100, à 0°C, 4°C, 13°C, l'équilibre ne semble pas atteint au bout de 4 semaines et à 35°C, 45°C, l'équilibre est sans doute perturbé du fait de l'autolyse des microorganismes.

Développement de la microflore :

Le tableau VI indique le temps de latence précédant le développement de la microflore, en fonction de la température et de la tension de vapeur d'eau relative.

Le tableau VII et les graphiques 1, 2, 3,4, indiquent en fonction de la température et de la tension de vapeur d'eau relative, l'évolution comparée des moisissures et des bactéries, aux points de vue qualitatif et quantitatif.

Le graphique V, obtenu en portant le nombre de germes totaux présents dans un gramme de farine au bout de 4 semaines, en fonction de la température et de la tension de vapeur d'eau relative, résume le phénomène.

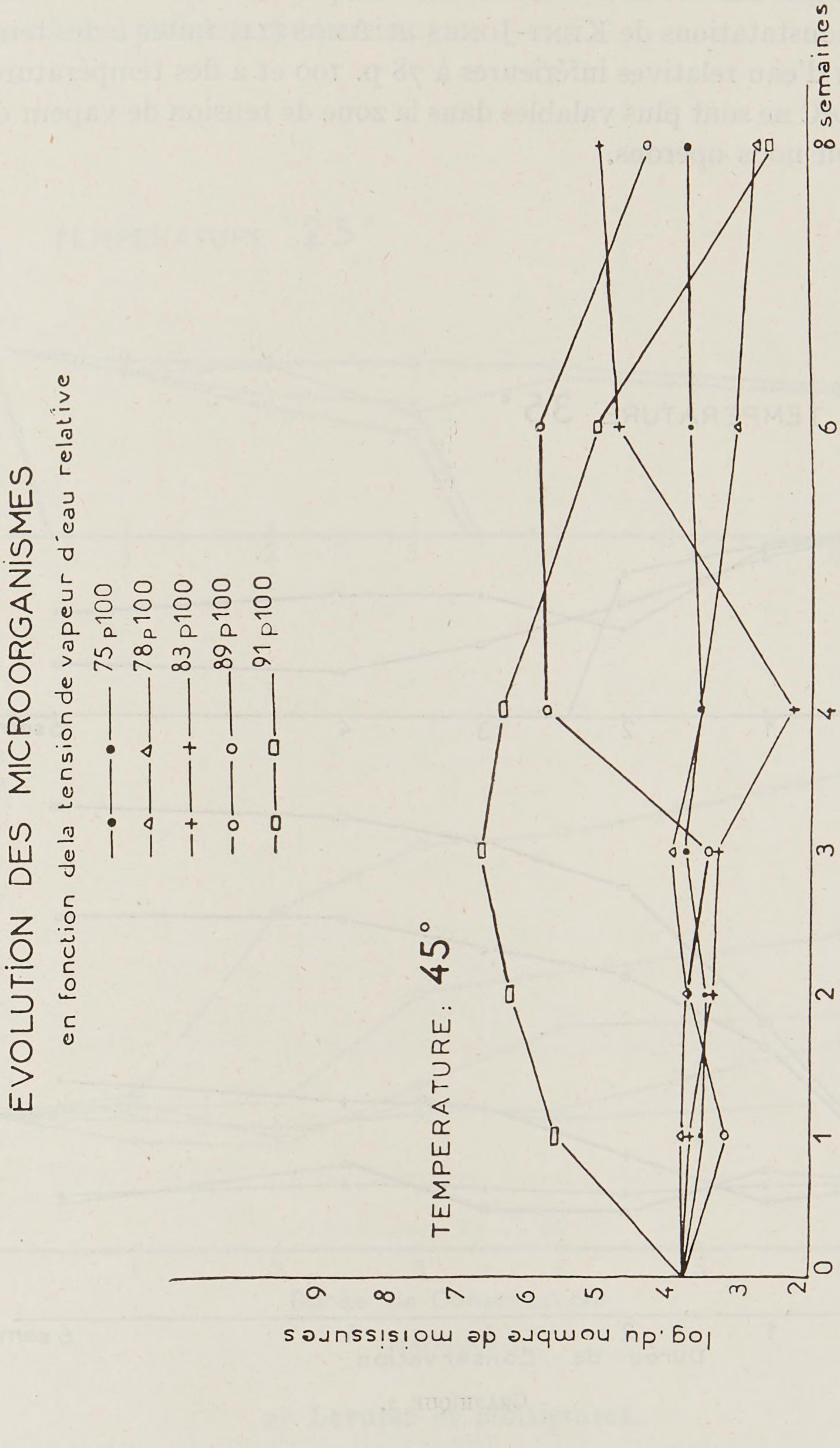
La proportion des différentes espèces de la microflore fongique des farines se modifie en fonction du temps quand l'humidité relative augmente : les *Aspergillus*, surtout *A. candidus* prédominent de plus en plus, sauf à 45°C où une Mucorinée occupe tout le terrain à 89 et 92 p. 100 d'humidité relative.

Tableau VII

Tension de vapeur d'eau relative en p. 100		De 0 à 4°C	13°C	25°C	35°C	45°C
70	*Moisissures*					Aucune évolution.
	Bactéries					Disparition presque totale dès la 1re semaine.
75	*Moisissures*	Pas d'évolution				
	Bactéries	Diminution				Disparition presque totale dès la 1re semaine.
78	*Moisissures*	Pas d'évolution		Augmentation après 5 semaines.	Pratiquement pas d'évolution.	Légère diminution après 4 semaines.
	Bactéries	Diminution			Disparition presque totale à la 6e semaine.	Disparition presque totale dès la 1re semaine.
83	*Moisissures*	Pas d'évolution		Augmentation après 3 semaines.	Augmentation la 2e semaine. Augmentation de la proportion d'Aspergillus.	Diminution lente puis reprise de croissance après 5 semaines.
	Bactéries	Diminution		Diminution puis disparition presque totale en 3 semaines.	Disparition presque totale en 2 semaines.	Disparition presque totale dès la 1re semaine.
89	*Moisissures*	Pas d'évolution		Augmentation rapide après 2 semaines.	Augmentation très rapide dès la 1re semaine. Augmentation de la proportion d'Aspergillus.	Augmentation après la 3e semaine. Diminution après 6 semaines. Une mucorinée occupe le terrain.
	Bactéries	Diminution		Disparition presque totale en 3 semaines.	Disparition presque totale dès la 1re semaine.	

Tableau VII (Suite)

Tension de vapeur d'eau relative en p. 100		De 0 à 4°C	13°C	25°C	35°C	45°C
92	*Moisissures*	Pas d'évolution	Augmentation après 2 semaines.	Augmentation très rapide après 1 semaine. Augmentation de la proportion d'Aspergillus.	Augmentation très rapide dès la 1re semaine. Aspcandidus occupe presque exclusivement le terrain.	Augmentation rapide dès la 1re semaine, diminution après 3 semaines, disparition presque totale au bout de 10 semaines. Une mucorinée occupe tout le terrain.
	Bactéries	Diminution lente	Augmentation au début puis disparition presque totale après 4 semaines.	Disparition presque totale la 2^{e} semaine.	Disparition presque totale dès la 1re semaine.	Disparition presque totale dès la 1re semaine.
95	*Moisissures*	Pas de variations en 4 semaines. Après 10 semaines envahissement par P. vert sp.				
100	*Bactéries*	Légère augmentation.				

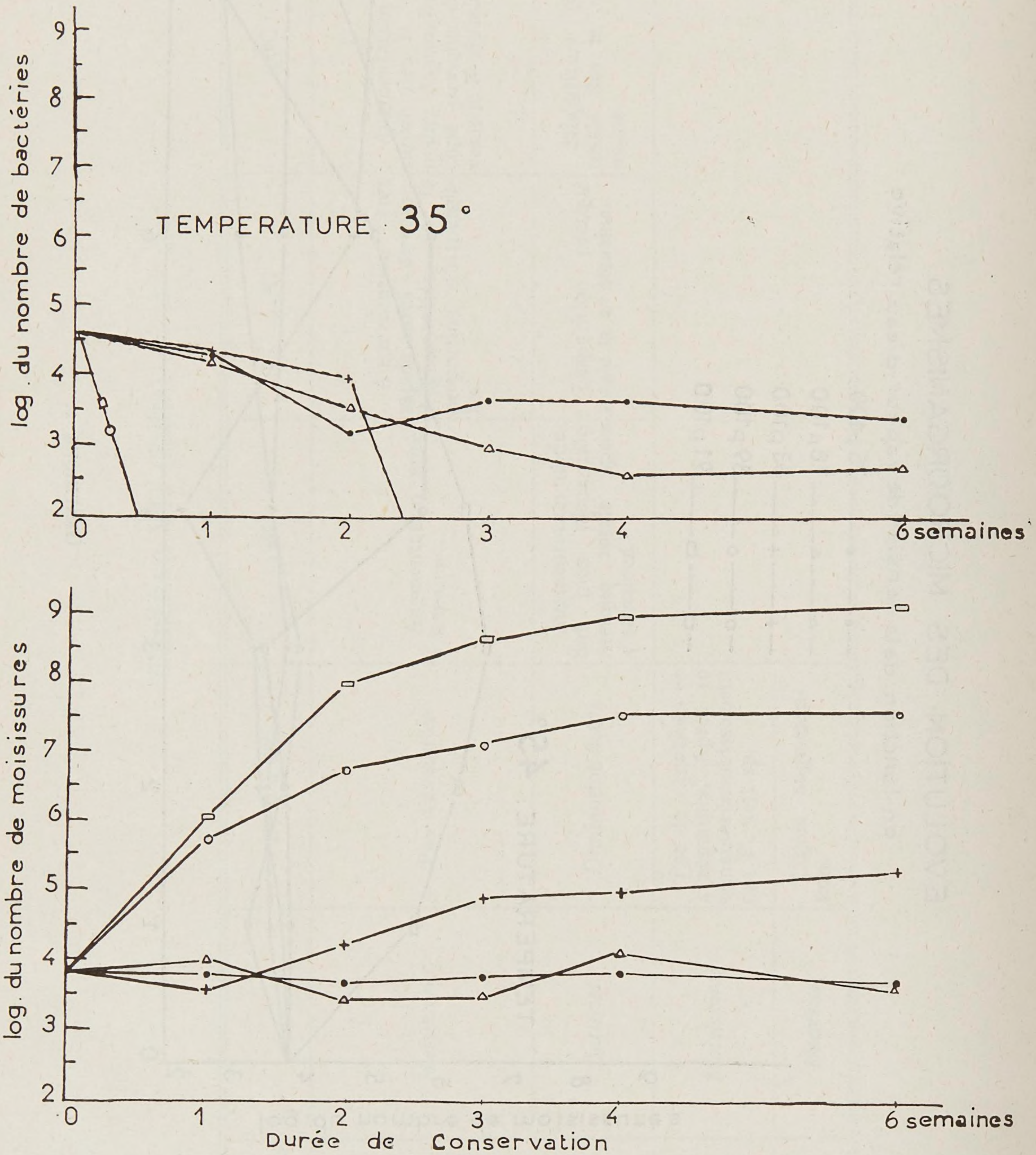

EVOLUTION DES MICROORGANISMES
en fonction de la tension de vapeur d'eau relative
75 p100
78 p100
83 p100
89 p100
91 p100
TEMPERATURE : 45°
log. du nombre de moisissures
2
3
4
5
6
7
8
9
0
1
2
3
4
6
8 semaines

GRAPHIQUE I.

D. — **Discussion.**

1° **Bactéries.**

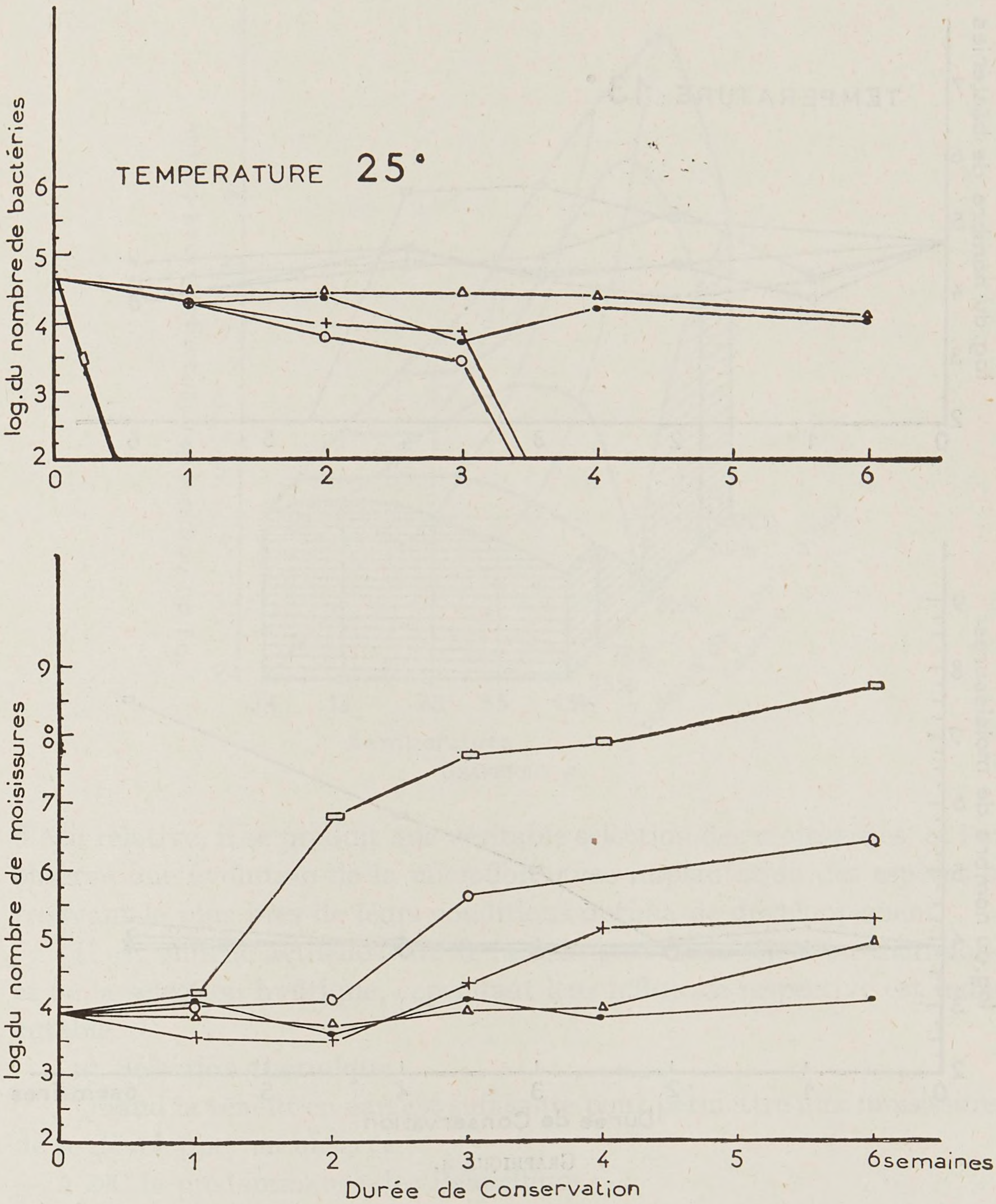
Les constatations de KENT-JONES et AMOS (11) faites à des tensions de vapeur d'eau relatives inférieures à 78 p. 100 et à des températures de 15°C et 20°C ne sont plus valables dans la zone de tension de vapeur d'eau relative où nous opérons.



GRAPHIQUE 2.

Comme BARTON-WRIGHT (4) nous avons observé une diminution du nombre de bactéries d'autant plus rapide que la tension de vapeur d'eau relative augmente. En outre, pour une même tension de vapeur d'eau

relative, l'élévation de la température entraîne la diminution des bactéries. Ce fait est à rapprocher de celui signalé par PELTIER (21) dans son travail sur Pseudomonas citri. Cependant à 13°C pour une tension de vapeur d'eau relative de 92 p. 100, on observe d'abord une augmentation des bactéries, puis une diminution.



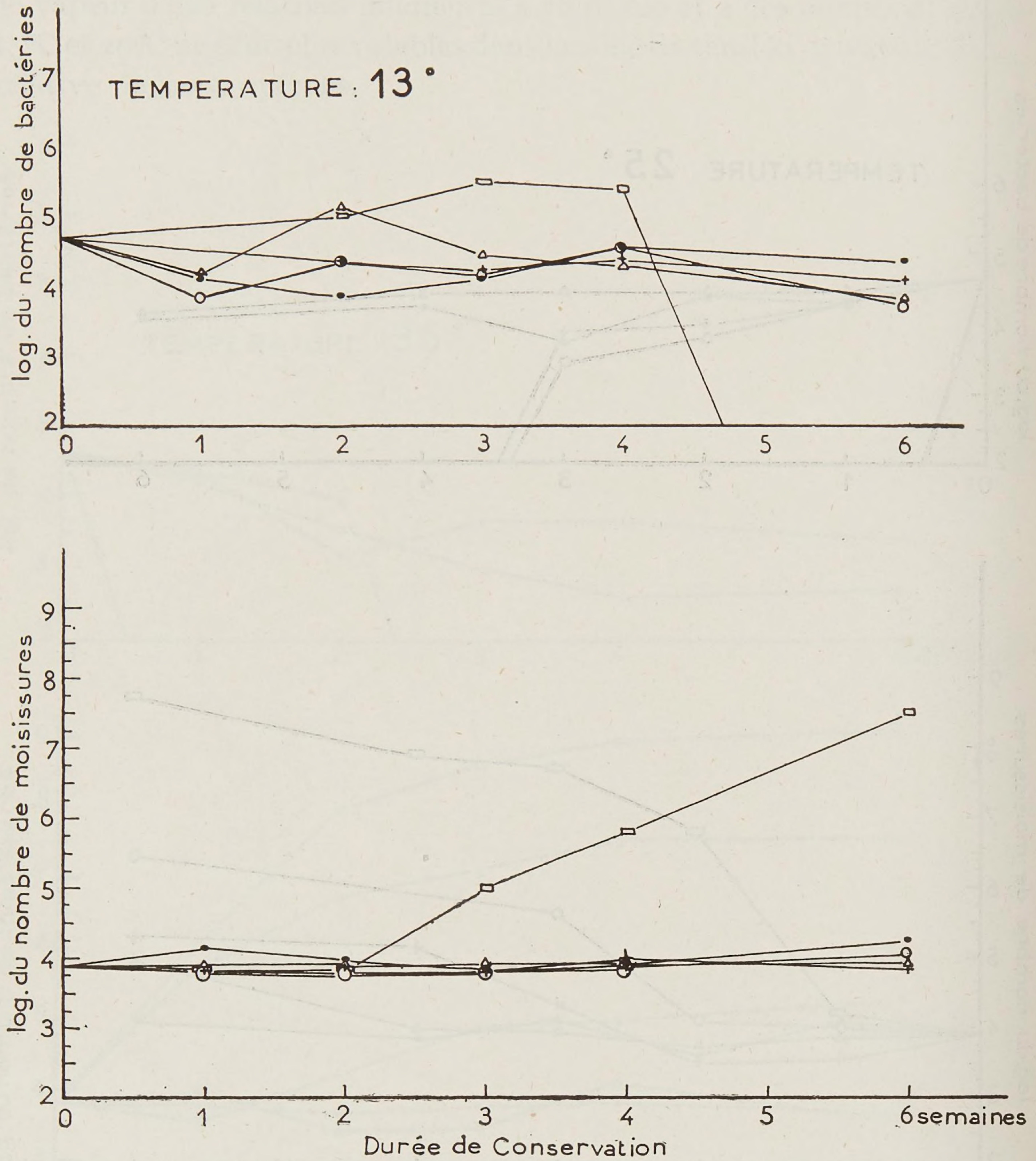
GRAPHIQUE 3.

2° Levures et Moisissures.

Au cours de la régression plus ou moins complète des bactéries, le nombre de levures ne varie pas tandis que les moisissures pratiquement stabilisées jusqu'à 75 p. 100 d'humidité relative commencent à se multi-

plier à partir de 25°C à 78 p. 100 d'humidité relative. Ceci confirme que les accidents microbiologiques subis par les farines au cours du stockage ne peuvent être que d'origine fongique.

La multiplication des germes fongiques à une température déterminée est d'autant plus rapide que la tension de vapeur d'eau relative est



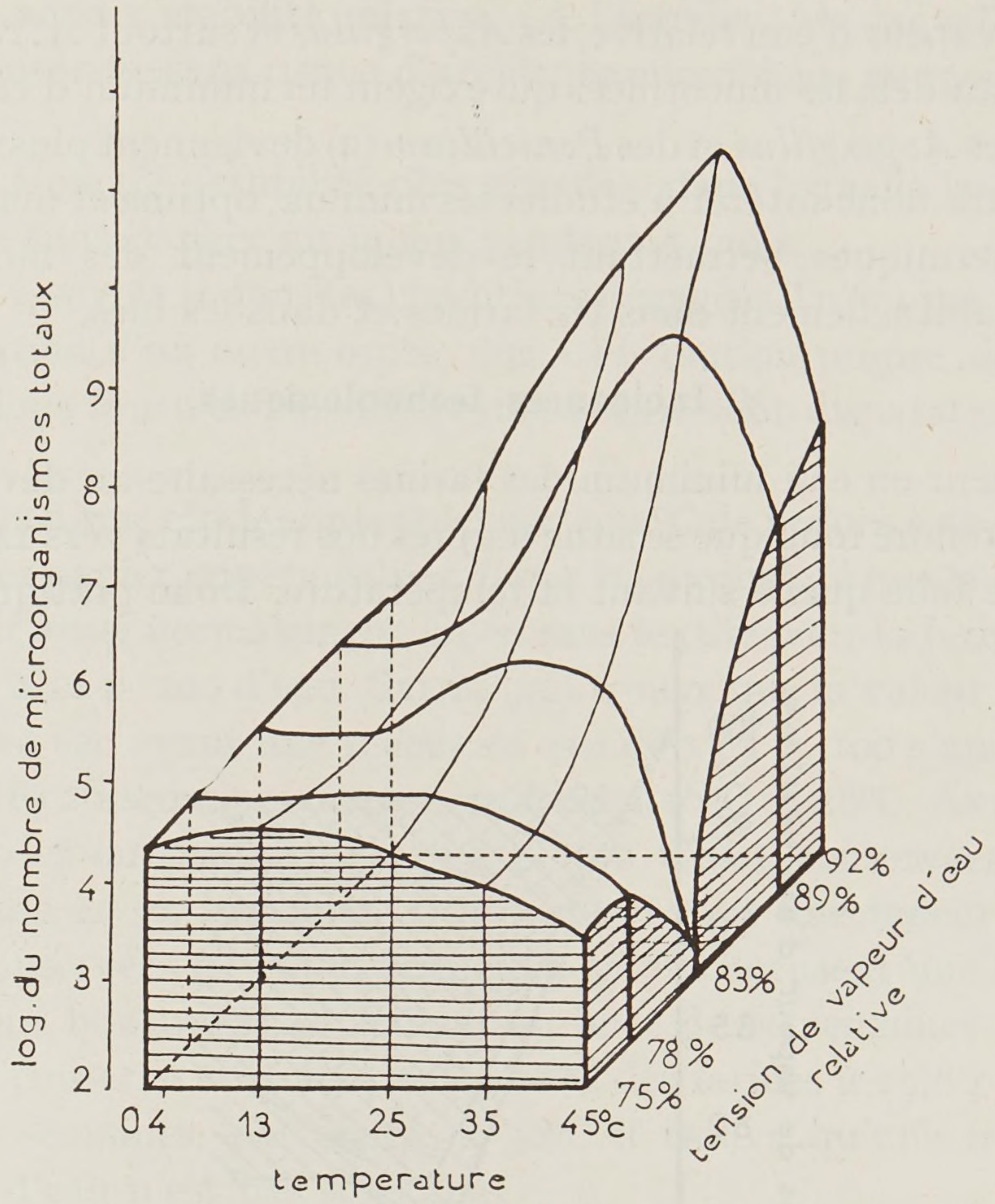
GRAPHIQUE 4.

plus élevée. Ces faits sont en accord avec les observations de BARTON-WRIGHT (18).

Pour une tension de vapeur d'eau relative déterminée la multiplication des moisissures est fonction de l'élévation de température jusque vers 35°C. Au-delà, le phénomène devient plus complexe, la multiplication est moins rapide, sans doute parce que le microclimat ainsi réalisé

s'éloigne de plus en plus des conditions optima nécessaires au développement des moisissures présentes dans la farine.

Sous l'action combinée de la température et de la tension de vapeur



Graphique 5.

d'eau relative, il se produit une véritable sélection des moisissures, et l'on observe une évolution de la microflore avec implantation des espèces se trouvant le plus près de leurs conditions optima de développement.

Il est difficile actuellement de faire la part de la sélection thermique et de la sélection hydrique, cependant leur influence respective est indiscutable.

a) Sélection thermique.

Quand la teneur en eau est suffisante pour permettre aux moisissures de se développer on observe :

— à 4°C la prédominance des Penicillium ;

— puis jusque vers 35°C une augmentation progressive de la proportion d'*Aspergillus*, plus particulièrement d'*Aspergillus candidus*

— Au-delà de 35°C et notamment à 45°C une mucorinée se trouvant initialement dans la farine en très petite quantité occupe presque seule le terrain. Cette température est plus favorable au développement de la mucorinée qu'à celui des autres moisissures présentes ; elle est même léthale pour *P. glaucum* (2).

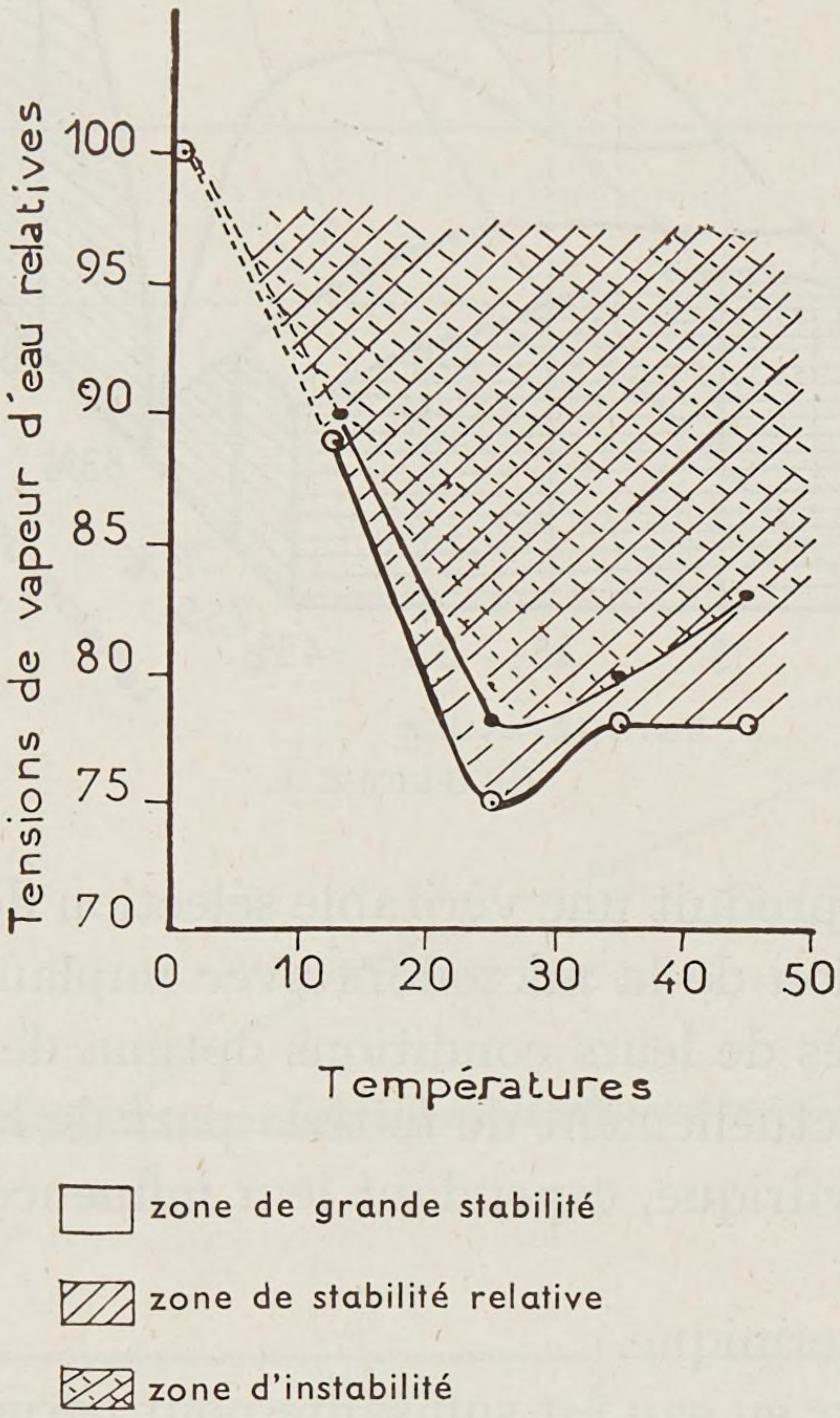
b) Sélection hydrique.

La microflore fongique des farines est normalement à caractère xérophyte. A 35°C et 45°C, respectivement jusque vers 90 p. 100 et 80 p. 100 de tension de vapeur d'eau relative, les *Aspergillus* et surtout *A. candidus* prédominent, au-delà les mucorinées qui exigent un minimum d'eau plus élevé que celui des *Aspergillus* et des *Penicillium* (2) deviennent plus abondantes.

Il y aura donc intérêt à étudier les minima, optima et maxima hydriques et thermiques permettant le développement des moisissures se trouvant habituellement dans les farines et dans les blés.

3° Incidences technologiques.

La teneur en eau minimum des farines nécessaire au développement de leur microflore fongique se situe d'après nos résultats vers 14,5-16 p. 100 de la farine telle quelle suivant la température. Donc pratiquement, une



GRAPHIQUE 6.

farine ayant une teneur en eau inférieure à 14-15 p. 100 (1) conservée dans un récipient étanche à l'eau, ne risque pas d'accident microbiologique, jusqu'à une température de 45°C.

Le graphique VI permet de prévoir le comportement d'une farine au cours du stockage :

En portant en abscisse les températures et en ordonnée les tensions

(1) Cette valeur a été obtenue par la méthode (au P_2O_5) 20), elle est donc supérieure de 0,5 à 0,8 p. 100 au chiffre fourni par la méthode de dosage de l'eau à 102°C.

de vapeur d'eau relatives pour lesquelles la conservation est compromise au cours de la période étudiée (soit ici 4 semaines et plus de 5 mois) on obtient le tracé des courbes délimitant :

1° une zone « stabilité relative » à l'intérieur de laquelle la farine peut être conservée sans risque d'accidents microbiens, au moins pendant 4 semaines ;

2° une zone de « stabilité plus grande » dans laquelle la farine peut être stockée sans danger au moins pendant 5 mois.

Il reste à savoir si dans les conditions dégagées il n'y a pas d'accidents de conservation d'un autre ordre, dus à l'évolution propre de la farine Les indications fournies par différents auteurs sont disparates et contra. dictoires.

Au cours d'une étude sur le stockage à 22°C de farines à 12 et 17 p. 100 d'eau, en sacs papier imperméables, BURE (1) a constaté que la maturation se produisait aussi normalement qu'en sacs textile pour la farine, initialement saine, à 12 p. 100 d'eau. CALLA (22) trouve que la valeur boulangère des farines en sac ayant une teneur en eau de 13,5 p. 100 s'améliore, puis diminue après 26 semaines de conservation à 16°C et 28°C. ANDREWS (23) signale que des farines à 11 et 13,5 p. 100 d'eau, conservées à 40°C ne rancissent pas en 35 semaines. Des farines ayant une teneur en eau de 14 p. 100 conservées en boîtes fermées à 37,8°C accusent une diminution de leur valeur boulangère seulement au bout de 10 semaines (24). Enfin THOMAS (6) conserve sans accident à 20°C des farines à 15,8 p. 100 d'eau pendant 26 semaines, par contre à 30°C il trouve qu'une farine ayant 14,5 p. 100 d'eau n'est pas stockable.

C'est pourquoi il serait intéressant d'examiner systématiquement le comportement de la valeur boulangère des farines ayant des teneurs en eau de 12 et 16 p. 100 d'eau conservées en sac papier imperméable à des températures comprises entre 15°C et 40°C.

IV. — RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Le travail effectué sur la microflore des farines françaises a permis d'aboutir aux conclusions et résultats suivants :

1° Mise au point d'une méthode de numération permettant de dénombrer le maximum de germes microbiens présents dans les farines.

2° Le nombre de bactéries des farines fraîches est plus élevé que celui des moisissures, mais on ne trouve pas de rapport constant entre eux.

3° Les moisissures sont présentes en moins grand nombre dans les blés que dans les farines.

4° Quantitativement et qualitativement la microflore des farines françaises examinées est très voisine de celles des farines étrangères

(américaines, canadiennes, belges, allemandes, anglaises). Le genre *Aspergillus* est très abondamment représenté ; *A. candidus* en est l'espèce le plus fréquemment rencontrée.

5° Le nombre de bactéries diminue en fonction du temps d'autant plus rapidement que la tension de vapeur d'eau relative et la température augmentent.

6° La multiplication des moisissures à une température déterminée est d'autant plus rapide que la tension de vapeur d'eau relative est plus élevée.

7° Pour une tension de vapeur d'eau relative déterminée la multiplication des moisissures est fonction de l'élévation de température jusque vers 35°C.

8° La proportion des différentes espèces de la microflore fongique des farines se modifie en fonction du temps, quand la température et la tension de vapeur d'eau relative varient, selon les optima de développement.

9° Pratiquement une farine conservée sans que sa teneur en eau dépasse 14-15 p. 100, ne risque pas d'accident microbiologique jusqu'à 45°C.

Reste à déterminer ce que deviennent dans ces conditions ses qualités boulangères.

Reçu pour publication le 8 mars 1956.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1). — BURE (J.). — Conservation des farines en sacs papier. Essais effectués en 1949 et 1950 à l'École Française de Meunerie et avec les Grands Moulins de Paris.

(2). — SEMENIUK (G.). — Microflora. Storage of Cereal grains and their Products. Publ. 1954 by the American Association of Cereal Chemists. St. Paul Minnesota, p. 77-151.

(3). — ZELENY (L.). — Chemical, physical and nutritive changes during storage. Storage of cereal grains and their products. Publ. 1954, by the American Association of Cereal Chemists St. Paul Minnesota, p. 46-76.

(4) BARTON-WRIGHT (E. C.). — Studies on the storage of wheaten flour : III changes in the flora and the fat and the influence of these changes on gluten character. *Cereal Chem.*, **15**, 521-541, 1938.

(5) FISHER (E. A.), HALTON (P.) and CARTER (R. H.). — Studies on the storage of wheaten flour. I. The influence of storage on the chemical composition and batung quality of flour. *Cereal Chem.*, **14**, 135-161, 1937.

(6) THOMAS (B.). — Die Trocknung von Mehl zur Erhöhung seiner Haltbarkeit. *Z. ges. Getreidew.*, **27**, 7-12, 1940.

(7) EMONS (C. W.). — Medical mycology. *Botan. Rev.*, **6**, 474-514, 1940.

(8) SARTORY (A.), and SARTORY (R.). — Presence of Aspergillus fumigatus, type Fresenius in a damaged flour. *J. Pharm. Alsace Lorraine*, **53**, 58-59, 1926. *Chem. Abstract*, **20**, 2210.

(9) CHRISTENSEN (C. M.). — The quantitative determination of molds in flour. *Cereal Chem.*, **23**, 322-329, 1946.

(10) JAMES (N.) and SMITH (K. N.). — Studies on the microflora of flour. *Can. J. Research*, **26**C, 479-485, 1948.
(11) KENT JONES (D. W.), and AMOS (A. J.). — Preliminary studies in the bacteriology of wheat and flour. *Analysis*, **55**, 248-268, 1930.
(12) KEILLING (J.), CASALIS (J.), SAVIGNAC. — Conservation des farines en sacs papier (voir 1). Communication personnelle des auteurs.
(13) SOENEN (M.) et PINGUAIR (R.).— Contribution à l'étude bactériologique des farines et son importance en Meunerie et en Boulangerie. *Congr. intern. Tech. et Chim. Ind. agr.* — Compte rendu 5e Congrès Budapest, **2**, 189-208, 1937.
(14) CHRISTENSEN (C. M.) and COHEN (M.). — Numbers, kinds, and source of molds in flour. *Cereal Chem.*, **27**, 178-185, 1950.
(15) HOLTMAN (D. F.). — The microbial content of soft wheat flour. *J. Bact.*, **30**, 359-361, 1935.
(16) HOLLIGER (N.). — Bakteriologische Untersuchungen über Mehlteiggärung. *Centr. Bakt. Parasitenk*, **2**, abt. 9, 395-425 et 521-537, 1902.
(17) GUSTAFSON (C. N.) and PARFITT (E. H.). — Effect of numbers of bacteria on the development of rancidity in soft wheat flour. *Cereal Chem.*, **10**, 233-238, 1933.
(18) BARTON WRIGHT (E. C.) and TOMKINS (R. G.). — The moisture content and growth of mould in flour, bran, and middling. *Cereal Chem.*, **17**, 332-342, 1940.
(19) SCHULZ (A.). — Neuere Untersuchungsergebnisse über die Klumpenbilgung bei Mehl. *Getreide Mehl und Brot*, p. 419, 1949.
(20) GUILBOT (A.). — Le dosage de l'eau dans les céréales. Compte-rendu de la Journée préparatoire d'étude sur le séchage, 185-192, mai 1952.
(21) PELTIER (G. L.). — Influence of temperature and humidity on the growth of pseudomonas citri and its host plants and on infection and development on the disease. *J. Agr. Research*, **20**, 447-506, 1920.
(22) CALLA (A. G.), GAIG (J. D.) and PAUL (A. D.). — Effect of various conditions of storage on baking quality of flour. *Can. J. Research*, 17C, 452-459, 1939.
(23) ANDREWS (J. S.). — Expériences with fat deterioration in cereals and cereal products. In Quartermaster Corps Manual 17-7, Committee on Foods Research, Conference on deterioration of fats and oils ; pp. 130-132, Office of the quartermaster general, Washington, D. C. 1945.
(24) CUENDET (L. S.), LARSON (E.) and MORRIS (C. G.) and GEDDES (W. F.). — The influence of moisture content and other factors on the stability of wheat flours at 37,8°C. *Cereal Chem.*, **31**, 362-389, 1954.

ALCOOL ÉTHYLIQUE ET MÉTABOLISME AZOTÉ

II. — INFLUENCE DE L'ALCOOL DILUÉ ET D'UN VIN NATUREL SUR L'UTILISATION PHYSIOLOGIQUE DE L'AZOTE ALIMENTAIRE CHEZ LE RAT

PAR

Jean CAUSERET, Denise HUGOT et Michel FLANZY
Laboratoire de Physiologie de la Nutrition, Paris.
Station Centrale de Recherches sur l'Œnologie, la Cidrerie
et les Jus de Fruits, Narbonne.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

II. — Techniques expérimentales :
1° Expérience préliminaire : effet de l'alcool et du vin sur la consommation de nourriture.
2° Protocole de l'expérience.

III. — Résultats.

IV. — Conclusions.

Bibliographie.

I. — INTRODUCTION

Dans un travail antérieur (2), nous avons étudié l'effet de l'alcool dilué et d'un vin naturel sur la dépense azotée endogène. Ce travail nous a conduits aux conclusions suivantes :

1° L'administration de ces boissons à de jeunes rats soumis à un régime ternaire provoque, pendant une courte durée, une « décharge » d'azote urinaire qui affecte la balance azotée dans un sens défavorable.

2° Cette décharge ne peut s'expliquer qu'en partie par un effet de lavage de l'urée préexistante du sang et des tissus.

3° En quelques jours tout au plus, la perte d'azote urinaire des animaux recevant de l'alcool ou du vin reprend la même valeur que celle de sujets recevant un volume d'eau identique ou celle d'animaux témoins. Dans l'étude des effets de l'alcool sur le métabolisme azoté, il convient donc de tenir compte de la possibilité de phénomènes d'accoutumance.

Il nous a paru intéressant de reprendre les expériences en les faisant porter sur des animaux soumis à un régime contenant des protides. En effet, il n'était pas évident *a priori* que l'influence de l'alcool sur la balance azotée, très nette chez des sujets soumis à un régime ternaire, se manifestât également lorsque le régime est normal.

II. — TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

1° Expérience préliminaire : effet de l'alcool et du vin sur la consommation de nourriture.

Dans notre première série d'expériences, nous avions constaté que les rats auxquels on administre de l'alcool dilué ou du vin, réduisent spontanément leur consommation de nourriture pendant quelques jours, sans que cette réduction puisse s'expliquer par l'apport supplémentaire de calories sous forme de boisson alcoolique. Un tel fait rendait difficile l'interprétation des résultats obtenus, car la décharge d'azote urinaire observée aurait pu s'expliquer, non par un effet direct de l'alcool sur le catabolisme azoté, mais par la sous-alimentation elle-même. Une expérimentation complémentaire avait montré que la sous-alimentation n'avait pas exercé d'influence sur les résultats obtenus.

Cependant, avant d'établir le protocole expérimental du présent travail, nous avons cru nécessaire de rechercher si le même phénomène se produisait chez des rats soumis à un régime contenant des protides (1) et recevant une dilution alcoolique de 10° ou un vin naturel de même titre, à la dose de 6 ml p. 100 g de poids corporel et p. jour. Les résultats obtenus sont indiqués dans le *tableau I*.

TABLEAU I

Influence de l'alcool et du vin sur la consommation de nourriture et sur l'apport calorique des ingesta.

Périodes	Consommation de nourriture	Apport calorique		
		du régime	des boissons	total
1. Effets de l'alcool	g. p. jour	cal. p. jour	cal. p. jour	cal. p. jour
1er — 5e jours (sans alcool) ...	12,4	52	0	52
6e — 10e jours (avec alcool) ...	5,0	21	9	30
11e — 15e jours (id.)	7,8	33	8	41
16e — 20e jours (id.)	10,7	45	8	53
2. Effets du vin				
1er — 5e jours (sans vin)	12,1	51	0	51
6e — 10e jours (avec vin)	5,1	21	9,5	30,5
11e — 15e jours (id.)	7,0	29	8,5	37,5
16e — 20e jours (id.)	9,9	42	9	51

On voit que l'administration d'alcool ou de vin entraîne une réduc-

(1) Il s'agit du régime protidique dont la composition est indiquée plus loin.

tion immédiate et très marquée (quoiqu'elle soit très variable d'un sujet à un autre) de la consommation de nourriture, réduction qui provoque elle-même un abaissement de l'apport calorique total des ingesta. Par la suite, la consommation de nourriture reprend progressivement sa valeur initiale.

En conséquence, dans l'expérience suivante, les animaux dont le régime ne comprenait ni alcool, ni vin, ont reçu des quantités de nourriture limitées, du même ordre de grandeur que celles consommées spontanément, en moyenne, par les sujets qui, aux mêmes phases de l'expérience, ingéraient de l'alcool ou du vin.

2° Protocole de l'expérience.

Le protocole de l'expérience est résumé dans le *tableau II*.

TABLEAU II

Protocole expérimental.

Jours	Régimes	Boissons	Signification expérimentale
1er — 3e	R. ternaire (ad lib.)	Néant	Accoutumance au régime ternaire
4e — 8e	Ibid.	Néant	Période métabolique
9e — 11e	R. protidique (ad lib.)	Néant	Accoutumance an régime protidique
12e — 16e	Ibid.	Néant	Période métabolique
17e — 21e	R. protidique (env. 5 g. p. jour)	Lot I : Néant Lot II : eau dist. Lot III : alcool (10°) Lot IV : vin (10°)	Ibid.
22e — 26e	R. protidique (env. 7,5 g. p. jour)	Ibid.	Ibid.
27e — 31e	R. protidique (env. 10,5 g. p. jour)	Ibid.	Ibid.

Les sujets d'expérience étaient des rats blancs adultes, du sexe mâle, qui pesaient initialement de 200 à 300 g. Les deux régimes auxquels ils ont été soumis successivement avaient la composition suivante :

	Régime ternaire	Régime protidique
	—	—
Peptone pancréatique	0	10
Amidon	50	45
Saccharose..................................	32	27
Huile d'arachide	12	9
Mélange salin de Hubbel	4	0
Mélange salin de Hubbel sans CO_3Ca	0	2 (1)
Levure de bière	0	5
Agar-agar	2	2

Dans le régime ternaire, les vitamines du groupe B et la vitamine K étaient introduites aux doses suivantes : thiamine, 2 mg ; riboflavine, 3 mg ; pyridoxine, 2,5 mg ; acide nicotinique, 50 mg ; pantothénate de calcium,

(1) La peptone utilisée étant riche en calcium, il a été nécessaire de supprimer CO_3Ca du mélange salin.

10 mg ; vitamine K hydrosoluble, 1 mg. Dans le régime protidique, ces vitamines étaient fournies par la levure. Quant aux facteurs liposolubles, ils étaient incorporés dans les deux cas à l'huile d'arachide, sous forme de 1. p. 100 d'huile de foie de morue titrant 2 000 U. I. de vitamine A et 500 U. I. de vitamine D par centimètre cube.

Le régime ternaire contenait 0,04 p. 100 d'azote et le régime protidique 1,83 p. 100 (soit environ 11,4 p. 100 de protides). Tous deux ont été présentés aux animaux sous forme de bouillie.

A partir du 12e jour, l'eau, la dilution alcoolique et le vin ont été administrés par intubation gastrique [1] aux animaux des lots II, III et IV, à la dose quotidienne de 6 ml p. 100 g de poids (en 2 intubations, l'une à 9 h, l'autre à 17 h).

L'administration d'eau aux sujets du lot II était destinée à voir, par comparaison avec le comportement des sujets des lots III et IV, si l'alcool et le vin exerçaient un « effet de lavage » sur l'azote de l'organisme. La dilution alcoolique a été préparée à partir d'alcool rectifié extra-neutre. Quant au vin utilisé, c'était un vin rouge naturel de Tuchan de la récolte 1953, de macération totale, titrant 11°8 ; il a été ramené à 10° par addition d'eau distillée.

Pendant chaque période métabolique, la quantité de nourriture consommée a été mesurée et les excreta (fèces et urines) recueillis au moyen d'un dispositif décrit dans une autre publication (1). Les quantités d'azote ingérées et éliminées par voie intestinale ou rénale ont été évaluées par analyse des régimes, des fèces et des urines (microkjeldahl).

III. — RÉSULTATS

Les résultats sont groupés dans les *tableaux III* à *VI*. Les balances azotées mentionnées sur ces tableaux ont été calculées par différence entre l'azote ingéré et l'azote total excrété [2].

L'examen de ces tableaux conduit aux conclusions suivantes :

1° Dans les conditions de notre expérience, l'administration d'alcool dilué ou de vin aux animaux des lots III et IV entraîne tout d'abord un abaissement de la balance azotée beaucoup plus marqué que celui qui se manifeste sous la seule influence de la sous-alimentation chez les témoins (lot I) et chez les sujets qui reçoivent de l'eau (lot II). La balance tombe respectivement à — 53 mg et à — 30 mg pour les lots III et IV, alors qu'elle se maintient aux environs de — 10 mg pour les lots I et II. Il est même remarquable que la balance azotée prenne, sous l'effet de l'alcool ou du vin, une valeur *aussi basse ou même plus basse qu'au cours de l'inanition azotée*.

[1] Le procédé d'intubation est décrit dans une autre publication (2).

[2] Dans l'évaluation de l'azote ingéré, on n'a pas tenu compte de la faible quantité d'azote apportée par le vin, quantité qui peut être négligée.

TABLEAU III

Balance azotée des animaux témoins (lot I).

Régimes et périodes expérimentales	Rats	N ingéré	N fécal	N urinaire	N excrété total	Balance azotée
		mg par jour	mg par jour	mg par jour	mg par jour	mg par jour
Régime ternaire.	1	7,44	16,98	34,66	51,64	— 44,20
	2	6,84	19,46	45,52	64,98	— 58,14
	3	6,47	17,38	34,16	51,54	— 45,07
	4	6,32	17,16	51,56	68,72	— 62,40
	5	7,32	18,34	60,20	78,54	— 71,22
	6	7,36	20,04	45,40	65,44	— 58,08
	Moyenne					— 56,52
Rég. protidique : 1re période....	1	252,96	34,34	133,00	167,34	+ 85,62
	2	227,12	40,33	104,82	145,15	+ 81,97
	3	250,24	40,12	131,07	171,19	+ 79,05
	4	190,40	30,89	117,42	148,31	+ 42,09
	5	297,84	46,98	157,32	204,30	+ 93,54
	6	322,32	44,79	143,32	188,11	+ 134,21
	Moyenne					+ 86,08
2e période	1	108,80	17,44	106,82	124,26	— 15,46
	2	108,80	15,41	94,78	110,19	— 1,39
	3	108,80	22,18	94,92	117,10	— 8,30
	4	108,80	14,86	71,40	86,26	+ 22,54
	5	108,80	21,66	113,68	135,34	— 26,54
	6	108,80	17,58	138,32	155,90	— 47,10
	Moyenne					— 12,71
3e période	1	156,40	16,01	111,30	127,31	+ 29,09
	2	156,40	14,86	104,86	119,72	+ 36,68
	3	156,40	18,71	104,16	122,87	+ 33,53
	4	156,40	12,81	109,20	122,01	+ 34,39
	5	156,40	20,52	120,26	140,78	+ 15,62
	6	156,40	23,75	138,88	162,63	— 6,23
	Moyenne					+ 23,84
4e période	1	217,60	29,33	110,32	139,65	+ 77,95
	2	217,60	35,30	118,02	153,32	+ 64,28
	3	217,60	34,65	111,02	145,67	+ 71,93
	4	217,60	24,00	117,60	141,60	+ 76,00
	5	217,60	36,13	146,16	182,29	+ 35,31
	6	217,60	34,57	142,66	177,23	+ 40,37
	Moyenne					+ 60,97

2° Ces faits sont dus essentiellement à la valeur élevée de l'élimination rénale d'azote chez les sujets qui reçoivent de l'alcool ou du vin. L'élimination intestinale ne paraît pas affectée à cette phase de l'expérience.

3° Tandis que dans notre première série d'expériences, réalisée sur des sujets en inanition azotée, les animaux qui recevaient de l'eau présentaient un comportement intermédiaire entre celui des animaux qui recevaient de l'alcool ou du vin et celui des témoins, l'administration d'eau n'entraîne ici aucune conséquence particulière.

On peut donc conclure que l'effet défavorable de l'alcool ou du vin sur la balance azotée, observé au début de leur administration, résulte

TABLEAU IV

Balance azotée des animaux recevant de l'eau (lot II).

Régimes et périodes expérimentales	Rats	N ingéré	N fécal	N urinaire	N excrété total	Balance azotée
		mg par jour	mg par jour	mg par jour	mg par jour	mg par jour
Rég. ternaire.... (sans eau)	7	5,40	15,02	28,50	43,52	— 38,12
	8	5,14	12,42	43,56	55,98	— 50,84
	9	6,56	16,46	49,32	65,78	— 59,22
	10	7,76	8,14	44,90	53,04	— 45,28
	11	6,48	18,58	46,86	65,44	— 58,96
	12	6,60	12,02	61,70	73,72	— 67,12
	Moyenne					— 53,26
Rég. protidique : 1re période ... (sans eau)	7	246,16	32,18	125,65	157,83	+ 88,33
	8	258,40	37,90	133,17	171,07	+ 87,33
	9	193,12	27,48	122,15	149,63	+ 43,49
	10	293,76	37,71	116,20	153,91	+139,85
	11	257,04	29,24	111,30	140,54	+116,50
	12	228,48	23,29	137,02	160,31	+ 68,17
	Moyenne					+ 90,61
2e période (avec eau)	7	108,80	11,96	94,22	106,18	+ 2,62
	8	108,80	21,79	118,30	140,09	— 31,29
	9	108,80	18,46	96,04	114,50	— 5,70
	10	108,80	18,62	99,40	118,02	— 9,22
	11	108,80	10,22	106,96	117,18	— 8,38
	12	108,80	12,36	96,60	108,96	— 0,16
	Moyenne					— 8,69
3e période (avec eau)	7	156,40	18,92	100,38	119,30	+ 37,10
	8	156,40	29,86	116,76	146,62	+ 9,78
	9	156,40	13,75	111,72	125,47	+ 30,93
	10	156,40	20,13	128,66	148,79	+ 7,61
	11	156,40	13,48	112,00	125,48	+ 30,92
	12	156,40	16,89	131,74	148,63	+ 7,77
	Moyenne					+ 20,68
4e période (avec eau)	7	217,60	31,05	112,42	143,47	+ 74,13
	8	217,60	24,50	120,88	145,38	+ 72,22
	9	217,60	23,47	117,32	140,79	+ 76,81
	10	217,60	31,70	126,42	158,12	+ 59,48
	11	217,60	15,82	134,96	150,78	+ 66,82
	12	217,60	25,19	138,32	163,51	+ 54,09
	Moyenne					+ 67,26

d'une action directe sur le catabolisme azoté, plutôt que d'un simple effet de lavage de l'urée préexistante du sang et des tissus.

4° Si l'administration d'alcool ou de vin se poursuit, leur effet défavorable s'estompe très rapidement : 5 jours au plus après le début de l'administration, la balance azotée reprend une valeur à peu près comparable à celle des témoins et des sujets qui reçoivent de l'eau.

Ces divers faits ressortent clairement de la *figure* 1.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus confirment donc ceux de notre première série d'expériences : l'alcool et le vin peuvent exercer une influence défavorable sur la balance azotée, mais cette influence est transitoire. Le seul effet que nous n'ayons pas retrouvé ici concerne l'abaissement de la balance azotée dû à l' administration d'eau.

Tableau V

Balance azotée des animaux recevant de l'alcool (lot III).

Régimes et périodes expérimentales	Rats	N ingéré	N fécal	N urinaire	N excrété total	Balance azotée
		mg par jour	mg par jour	mg par jour	mg par jour	mg par jour
Rég. ternaire : (sans alcool) ..	13	3,51	10,98	28,81	39,79	— 36,28
	14	3,90	11,14	20,94	32,08	— 28,18
	15	3,72	10,65	27,66	38,31	— 34,59
	16	4,12	12,16	25,69	37,85	— 33,73
	17	3,64	14,84	26,88	41,72	— 38,08
	Moyenne					— 34,17
Rég. protidique : 1re période.... (sans alcool)	13	295,12	52,60	147,87	200,47	+ 94,65
	14	300,66	49,93	159,25	209,18	+ 91,48
	15	231,20	40,37	134,75	175,12	+ 56,08
	16	265,20	41,28	157,50	198,78	+ 66,42
	17	286,96	42,33	153,56	195,89	+ 91,07
	Moyenne					+ 79,94
2e période (avec alcool)	13	92,48	20,43	144,55	164,98	— 72,50
	14	92,48	17,15	163,10	180,25	— 87,77
	15	106,08	11,19	116,90	128,09	— 22,01
	16	81,60	11,18	140,35	151,53	— 69,93
	17	149,60	22,68	138,60	161,28	— 11,68
	Moyenne					— 52,78
3e période (avec alcool)	13	163,20	32,45	109,20	141,65	+ 21,55
	14	164,56	26,14	112,70	138,84	+ 25,72
	15	163,20	33,03	105,35	138,38	+ 24,82
	16	133,28	20,97	109,20	130,17	+ 3,11
	17	191,76	31,84	140,35	172,19	+ 19,57
	Moyenne					+ 18,95
4e période (avec alcool)	13	235,28	35,39	105,25	140,64	+ 94,64
	14	225,76	37,92	114,25	152,17	+ 73,59
	15	184,96	34,77	114,00	148,77	+ 36,19
	16	240,72	32,76	109,25	142,01	+ 98,71
	17	238,00	33,14	136,00	169,14	+ 68,86
	Moyenne					+ 74,39

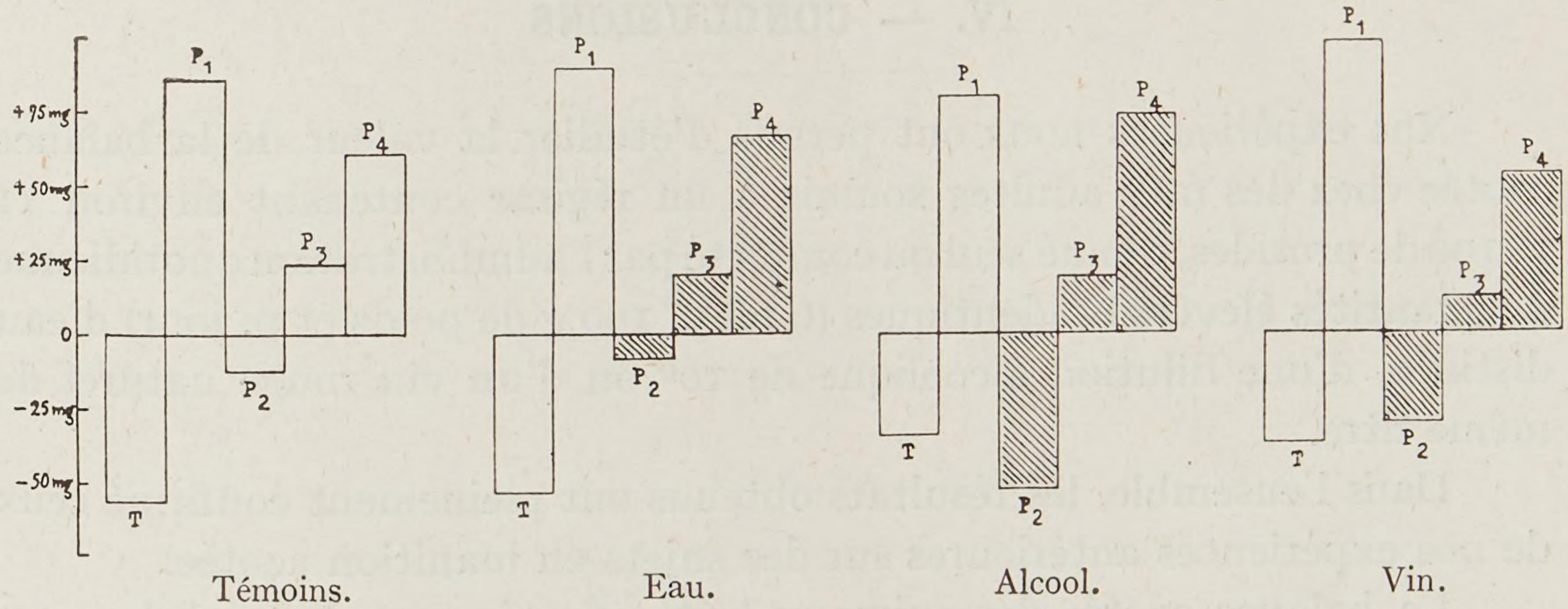


FIG. 1. — Évolution de la balance azotée au cours du temps.

T, période d'alimentation ternaire sans administration de boissons ; P_1, P_2, P_3, P_4, 1re, 2e, 3e et 4e périodes d'alimentation protidique. (Les parties hachurées correspondent aux périodes d'administration de boissons).

TABLEAU VI

Balance azotée des animaux recevant du vin (lot IV).

Régimes et périodes expérimentales	Rats	N ingéré	N fécal	N urinaire	N excrété total	Balance azotée
		mg par jour	mg par jour	mg par jour	mg par jour	mg par jour
Rég. ternaire : (sans vin)	18	4,90	16,91	32,98	49,89	— 44,99
	19	3,71	10,87	28,82	39,69	— 35,98
	20	3,85	11,33	26,26	37,59	— 33,74
	21	3,85	15,73	22,34	38,07	— 34,22
	22	4,40	13,57	27,80	41,37	— 36,97
	Moyenne					— 37,18
Rég. protidique · 1re période ... (sans vin)	18	282,88	46,08	120,75	166,83	+ 116,05
	19	319,60	53,92	124,25	178,17	+ 141,43
	20	244,80	39,15	132,12	171,27	+ 73,53
	21	227,12	47,57	128,19	175,76	+ 51,36
	22	190,40	38,14	87,94	126,08	+ 64,32
	Moyenne					+ 89,34
2e période (avec vin)	18	84,32	21,38	114,80	136,18	— 51,86
	19	141,44	32,87	115,50	148,37	— 6,93
	20	73,44	17,08	101,85	118,93	— 45,49
	21	78,88	20,56	127,75	148,31	— 69,43
	22	159,12	23,17	113,05	136,22	+ 22,90
	Moyenne					— 30,16
3e période (avec vin)	18	112,88	19,91	93,80	113,71	— 0,83
	19	159,12	41,57	103,60	145,17	+ 13,95
	20	184,96	43,55	105,70	149,25	+ 35,71
	21	144,16	31,29	91,00	122,29	+ 21,87
	22	127,84	33,93	104,30	138,23	— 10,39
	Moyenne					+ 12,06
4e période (avec vin)	18	233,92	47,93	112,25	160,18	+ 73,74
	19	197,20	45,07	112,00	157,07	+ 40,13
	20	255,68	46,64	127,00	173,64	+ 82,04
	21	187,68	33,33	100,75	134,08	+ 53,60
	22	163,20	35,25	112,00	147,25	+ 15,95
	Moyenne					+ 53,09

IV. — CONCLUSIONS

Nos expériences nous ont permis d'étudier la valeur de la balance azotée chez des rats adultes soumis à un régime contenant environ 11 p. 100 de protides, donné seul ou complété par l'administration quotidienne de quantités élevées et identiques (6 ml p. 100 g de poids et p. jour) d'eau distillée, d'une dilution alcoolique de 10° ou d'un vin rouge naturel de même titre.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus ont pleinement confirmé ceux de nos expériences antérieures sur des sujets en inanition azotée.

La balance azotée des animaux a été affectée tout d'abord dans un sens défavorable par l'alcool et par le vin, cet effet résultant lui-même d'une forte augmentation de l'élimination rénale d'azote. Mais cet effet n'a présenté qu'un caractère transitoire : en 5 jours tout au plus, la balance

azotée a repris une valeur voisine de celle observée chez les témoins et les sujets recevant de l'eau. Il apparaît donc que, de ce point de vue, l'organisme s'accoutume remarquablement vite à l'action de l'alcool.

Il semble bien que l'effet transitoire de l'alcool et du vin sur la balance azotée ne résulte pas d'un simple « lavage » de l'urée préexistante du sang et des tissus : en effet, l'administration de volumes d'eau importants à certains sujets n'a pas entraîné de modifications sensibles de la balance.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Les références bibliographiques des travaux antérieurs sont citées dans (3).

(1) CAUSERET (J.). — Recherches sur l'utilisation physiologique du calcium au cours de la croissance chez le Rat. Nouveaux aspects du rôle biologique de la vitamine D. *Ann. de Zootechnie*, 1954, **3**, 271.

(2) FLANZY (M.) et CAUSERET (J.). — Contribution à l'étude physiologique des boissons alcooliques. I. Etude comparée d'un vin et de l'alcool. *Ann. Technol. Agric.*, 1952, **1**, 227.

(3) FLANZY (M.), HUGOT (D.) et CAUSERET (J.). — Alcool éthylique et métabolisme azoté. I. Influence de l'alcool dilué et d'un vin naturel sur la valeur de la perte azotée endogène chez le Rat. *Ann. Technol. Agric.*, 1956, **5**, 319.

UNE NOUVELLE ALTÉRATION BACTÉRIENNE DANS LES VINS DE LIQUEUR

PAR

P. DUPUY

Station Centrale de Recherches sur l'Œnologie, la Cidrerie et les Jus de Fruits, Narbonne (Aude).

Une forte teneur en alcool n'est pas suffisante pour maintenir les vins de liqueur à l'abri de toute altération microbienne, et cela d'autant moins que ces vins, fabriqués avec des raisins très mûrs de cépages peu acides cultivés dans des régions chaudes, possèdent le plus souvent des pH élevés. La présence de sucre résiduel ne peut que favoriser le développement des bactéries.

Il est remarquable que de telles altérations n'aient été signalées que dans les pays nouvellement venus à la Viticulture :

— En Afrique du Sud, par FÉVRIER (1), puis NIEHAUS (2) ;
— En Australie, par FORNACHON (3) ;
— En Californie, par DOUGLAS, HOWARD et CRUESS (4) ;
— En Russie, par KVASNIKOV et ARYASHKINA (5) ;
— En Asie Centrale, par BERG et KONDO (6).

Nous n'avons pu trouver trace de telles maladies dans les observations réalisées en France. Elles sont d'autre part ignorées des praticiens.

Or, en 1955, il nous a été donné d'observer un lot de vins préparés à partir de divers cépages de muscats dont certains étaient fortement altérés et présentaient la viscosité caractéristique des vins « graisseux ». La maladie s'était déclarée au cours de la conservation et était provoquée par des bactéries longues et épaisses dont l'aspect morphologique ne correspondait pas à celui des espèces habituellement décrites dans le vin. L'aspect des bactéries était assez homogène pour laisser prévoir qu'elles appartenaient toutes à la même espèce. Comme la culture sur milieu solide ne présentait qu'un seul type de colonies, il est très vraisemblable que les modifications observées dans le vin sont l'œuvre d'un seul microorganisme.

La maladie.

La maladie s'est manifestée par un dégagement gazeux, par l'apparition d'un trouble et d'un dépôt abondant, ainsi que par l'augmentation de

viscosité du vin. On a pu apprécier les modifications chimiques en faisant l'analyse de deux vins dont l'un était indemne de l'affection microbienne. Bien que ces vins proviennent du même lot de raisin, ils diffèrent sensiblement du fait du mode d'addition et de la quantité d'alcool ajoutée. Tous les deux ont été vinifiés dans la même cave sans addition d'acide sulfureux. Ils ont été conservés dans les mêmes conditions.

L'analyse a donné les résultats suivants :

	Vin sain	Vin malade
Acidité totale en meq/l	61	131
Acidité volatile en meq/l	4,9	61
Acide lactique en meq/l	1,6	14
Acide malique en meq/l	8	0
pH	3,78	3,62
Alcool éthylique en degrés	16°	14°2
Alcool méthylique en mg/l	140	190
Sucres réducteurs en g/l	107	108
Mannite en g/l	0	6,6
Ammonium en NH_4 mg/l	6,8	52,7
Acétoïne en mg/l	3,6	1,2
Diacétyle	traces	traces
Schütteleffekt	1,02	2,64

La chromatographie sur papier ne permet pas de déceler des acides organiques fixes autres que ceux normalement présents dans le vin (tartrique, citrique, malique, lactique, et succinique).

Le Schütteleffekt permet d'apprécier l'augmentation de viscosité du vin en faisant le rapport de ses vitesses d'ascension dans une bande de papier avant et après secouage. La technique est décrite par MARTIN (7).

Cette analyse indique que l'on se trouve en présence d'un vin mannité. On enregistre la production de mannite à partir du levulose. De l'acide lactique s'est formé aux dépens de l'acide malique qui a totalement disparu. Les sucres ont dû contribuer aussi à la formation d'acide lactique puisqu'on en trouve 14 meq, alors que 8 meq d'acide malique n'auraient pu en produire que 4.

Il s'est formé aussi une quantité importante d'acide acétique (61 — 4,9 = 56,1 meq/l). Le métabolisme bactérien s'est accompagné d'une production particlièrement importante d'ammonium : 52,7 — 6,8 = 45,9 mg/l.

Présence d'un polyoside dans le vin.

La substance responsable de l'aspect graisseux du vin a été séparée de la manière suivante :

1 litre de vin clair reçoit, en agitant doucement, 1,5 l d'alcool à 95°, ce qui amène le milieu à 63°. On laisse deux heures à 0°C et on recueille ensuite le précipité formé par une centrifugation de 10 minutes à 3 000 g.

Le dépôt brunâtre repris dans 100 ml d'eau distillée donne une solution visqueuse si on a soin de ne pas le battre pour le dissoudre. On sépare la partie insoluble par une centrifugation de 30 minutes à 12 000 g. Sur la partie claire, on fait une seconde précipitation à l'alcool en ajoutant 400 cc. On laisse déposer 1 h à 0°C et il se forme un précipité blanc que l'on récupère par centrifugation. Le culot est mis en solution dans l'eau et dialysé 12 h contre de l'eau bi-distillée. On obtient un liquide verdâtre moins filant qu'à la première précipitation.

Le produit ainsi préparé est vraisemblablement souillé par les pectines et les gommes du vin qui précipitent, au moins partiellement, dans les mêmes conditions. On a effectué les dosages suivants que nous donnons à titre purement indicatif :

Azote total	$<$ 0,5 p. 100 du poids sec
Sucres réducteurs en glucose après hydrolyse	90 p. 100 du poids sec
Méthoxyle	4 p. 100 du poids sec

En milieu sulfurique 3,3 N, l'hydrolyse ne se produit pas à froid, mais elle est totale après 15 minutes d'ébullition. D'après les indications de la chromatographie sur papier, il y a libération de glucose et d'un pentose qui pourrait bien être du xylose d'après son Rf. On ne peut pas mettre en évidence de cétoses.

Ces quelques déterminations prouvent bien que c'est à la présence d'un polyoside bactérien qu'est dû l'état visqueux du vin et cela concorde parfaitement avec le résultat trouvé par MARTIN. Le polyoside ainsi purifié ne présente pas de propriétés antigéniques pour le lapin.

Identification de la bactérie. Isolement.

L'isolement s'est fait sans difficultés étant donné que le milieu ne contenait pas de germes aérobies. La maladie étant en pleine évolution, il n'a pas été nécessaire de faire une culture d'enrichissement. Une dilution du vin malade a été coulée dans un milieu gélosé en boîte de Petri. Comme la croissance de la bactérie est lente, il convient de maintenir les boîtes à l'étuve à 27° sous une cloche contenant de l'eau, afin d'éviter la dessiccation qui ne manquerait pas de se produire.

Le milieu qui a servi à l'isolement a été préparé de la façon suivante.

Du jus de raisin est mis à fermenter avec une forte proportion de levures de vin. On chauffe le milieu 30 minutes à 80°C pour autolyser les levures. Après avoir clarifié par centrifugation, on mélange par parties égales ce liquide avec du jus de raisin. On stérilise ce milieu en le pasteurisant 20 minutes à 80°C. Il se solidifie facilement en ajoutant un volume égal de gélose à 4 p. 100. Certaines boîtes ont été laissées à leur pH normal, soit 3,4. D'autres ont été ajustées à pH 4 avec de la soude.

Morphologie.

Les bactéries cultivées en milieu liquide à l'autolysat de levure à pH = 4,7 présentaient les caractères suivants :

Immobiles,

Pas d'endospores,

Pas de capsules décelables à la coloration,

Gram positif.

Forme bâtonnets présentant une grande variabilité suivant le pH du milieu de culture. A pH = 3, on voit des formes très courtes dont les tailles

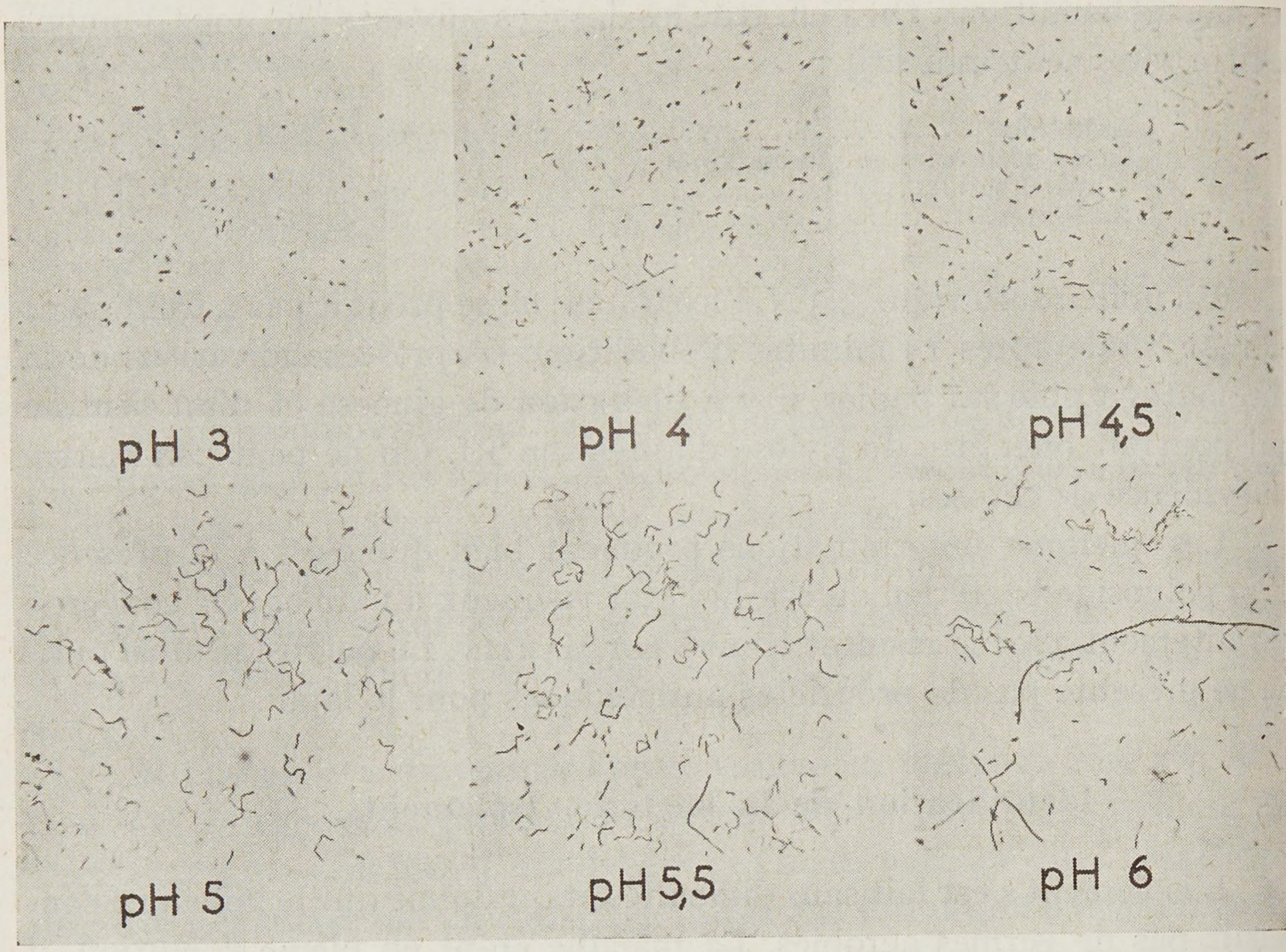


FIG. 1 — Bactéries après 14 jours de culture sur milieu à l'autolysat de levure à divers pH. — Bactéries non fixées entre lame et lamelle dans la gélatine. Éclairage en contraste de phase, obj. 40/o, 65, Oc 8, Panatomic. Cliché agrandi 2,3 fois.

sont variables, mais inférieures à 1μ ; elles font penser à des cocci plus qu'à des bactéries. Lorsque le pH s'élève de 3 à 6, le microbe prend la forme de bâtonnets d'abord isolés, puis groupés en chaînettes articulées. Ils deviennent de plus en plus épais et des formes filamenteuses apparaissent dans le milieu à pH = 6 (fig. 1).

Relation avec l'oxygène.

Bactérie microaérophile ne paraissant pas très exigeante sous le rapport de l'oxygène. Elle pousse très bien en milieu liquide recouvert d'une couche de paraffine à bas point de fusion.

Culture.

Le développement est lent sur tous les milieux, même dans les conditions optima.

Sur moût de bière gélosé :

Développement très faible après 15 jours à 27° sous forme d'irisation en surface.

Sur milieu au vin et jus de raisin gélosé :

L'ensemencement dans la masse permet le développement de petites colonies sphériques de 0,5 mm de diamètre. Apparition des colonies après 10 jours à 27°.

Sur moût de bière gélatiné :

L'ensemencement par piqûre donne après 8 jours à 21° une croissance faible et uniforme le long de la piqûre. Ensuite, la culture ne se développe plus et ne produit pas de liquéfaction de la gélatine.

Sur eau de levure :

Pas de développement après 30 jours en l'absence d'aliments carbonés. Avec 2 p. 100 de saccharose, le trouble apparaît à 27° après 7 jours. Un dépôt visqueux s'accumule au fond du tube et quelques flocons restent accrochés sur les parois.

Sur milieu à l'autolysat de levure :

On prépare la solution suivante :

Phosphate acide de potassium............	2,5 g
Sulfate de magnésium....................	75 mg
Sulfate de manganèse....................	15 mg
Sulfate de fer..........................	15 mg
Autolysat de levure.....................	10 g
	pour 1 litre

Le pH est ajusté à 4,7 avec de l'acide sulfurique. Le milieu est ensuite chauffé 20 minutes à 120° pour coaguler les protéines. On filtre, on répartit et on stérilise 20 minutes à 115°C. Avant l'emploi, on ajoute 2 p. 100 de saccharose stérilisé séparément.

C'est le milieu qui donne le développement le plus rapide. A 27°C, le trouble apparaît après 4 jours. Il se forme un dépôt abondant.

Développement suivant le pH.

Le milieu précédent à l'autolysat de levure a été ajusté à divers pH allant de 3 à 8. Les tubes ensemencés et placés à 27° ont donné les résultats suivants. A pH = 3 la croissance est à peine perceptible après 15 jours. A pH = 7 et au-dessus il n'y a plus de croissance. L'optimum

jugé d'après l'apparition du trouble est pH = 4,5. Le dosage du sucre disparu a été fait le 13e jour ; il a donné les résultats suivants :

pH	Sucre disparu en mg/cc
3	0
4	2,2
4,5	2,7
5	3,1
5,5	4,7
6	1,6
7	0
8	0

Le pH optimum pour la consommation du sucre est donc égal à 5,5.

Optimum de température.

Il a été déterminé dans le milieu à l'autolysat de levure à pH = 4,7 en mesurant l'augmentation d'acidité totale après 14 jours d'incubation. On a obtenu les résultats suivants :

Température	Augmentation d'acidité en meq/l
15°	0
21°	1
27°	18
36°	2,5

L'optimun se situe donc autour de 27° C.

Caractères biochimiques.

Les tests de fermentescibilité des sucres ont été réalisés dans le milieu à l'autolysat de levure et une seconde fois dans l'eau de levure. Après ensemencement, les tubes étaient recouverts de paraffine pour rendre visible un dégagement gazeux (méthode de GUERRA).

Les sucres suivants sont fermentés avec production de gaz et d'acides.

Levulose,	acides formés	63 meq/l
Glucose,	—	40 —
Saccharose,	—	43 —
Xylose,	—	27 —

Le galactose donne une très faible culture et produit 10 meq/l d'acides. On n'observe pas de dégagement gazeux.

Les substrats suivants ne donnent pas de développement ni de production d'acides :

Rhamnose, Arabinose, Raffinose, Maltose, Lactose, Mannitol, Sorbitol, Glycérol, Dextrine.

L'arbutoside n'est pas dédoublé.

Les citrate, malate, et tartrate ne produisent pas de développement.

Dans un milieu contenant d'autres aliments carbonés, l'acide malique est transformé en acide lactique.

Parmi les produits du métabolisme, on a trouvé l'acide acétique, l'acide lactique et le gaz carbonique. A partir du levulose, il y a production de mannitol.

Le test de la catalase est négatif.

Bactéries voisines déjà isolées du vin.

Les vins graisseux et mannités ont fourni aux microbiologistes plusieurs souches de microbes, qui ont été décrites successivement d'une façon plus ou moins précise. Nous allons passer en revue les descriptions les plus explicites.

En 1894 GAYON et DUBOURG (9,10), isolent des vins d'Algérie une bactérie qu'ils décrivent et différencient de celle de la tourne. L'étude de cette souche a été reprise en 1913-1918 par MULLER-THURGAU et OSTERWALDER (11,12) qui l'ont comparée à celles qu'ils avaient eux-mêmes isolées de vins et de jus de fruits. Les différences observées les ont conduits à en faire deux espèces distinctes. L'une *Bacterium gayonii* MULLER-THURGAU et OSTERWALDER dénommé plus tard *Lactobacillus gayonii* par PEDERSON et inclus dans la description de *L. fermenti* BEIJERINCK. L'autre *Bacterium mannipotoeum* MULLER-THURGAU dénommé plus tard *Lactobacillus mannitopoeus* par PEDERSON et inclus dans la description de *L. buchneri* (HENNEBERG) BERGEY et Al.

Le rattachement des bactéries mannitiques des vins à deux espèces distinctes est justifié par les différences suivantes. *L. gayonii* a un optimum thermique à 35°C et une activité importante à 45°C. Il n'attaque pas l'arabinose et ne transforme pas l'acide malique en acide lactique. Par contre, il attaque le lactose. *L. mannitopoeus* ne possède aucun de ces caractères.

En 1909, KAYSER et MANCEAU (13) isolent plusieurs souches de bactéries de la graisse à partir de vins de vignobles septentrionaux. Les auteurs n'ont pas réalisé d'isolements sur milieu solide, mais simplement des cultures enrichies. Leurs caractères les plus remarquables sont les suivants. Elles ont la forme de bâtonnets trapus, $4 \times 1{,}7\ \mu$ avec des dimensions supérieures à celles des ferments mannitiques décrits. Elles seraient nettement anaérobies alors que *L. gayonii* et *L. mannitopoeus* peuvent se développer aussi bien en présence qu'en absence d'oxygène. Elles ne poussent qu'en milieu acide, n'utilisent pas l'alcool et poussent sur la plupart des sucres. Ce sont des ferments hétérolactiques produisant du gaz carbonique, des acides lactique et acétique, de l'alcool, de la mannite à partir du levulose et aussi de la glycérine. Les bactéries de la graisse seraient donc des bactéries mannitiques.

En 1943, FORNACHON (8) publie un travail très important sur les bactéries mannitiques des vins de dessert. Les 110 souches, isolées par lui, ont été réparties en cinq groupes qui possèdent les caractères suivants.

Le groupe I n'attaque pas les acides organiques.

Les groupes III et IV ressemblent fort à *L. buchneri* (HENNEBERG) BERGEY et Al.

Les groupes II et V sont plus proches de *L. fermenti* BEIJERINCK.

Toutes ces bactéries possèdent en commun la propriété de supporter des doses d'alcool de l'ordre de 18°. Elles ne rendent pas le vin filant.

En 1948, L. MARTIN (7) décrit une bactérie isolée d'un vin suisse sec, devenu filant. Il s'agit d'un cocci ou d'un très court bâtonnet. Ce microorganisme est encore capable de se développer au pH remarquablement bas de 2,8. L'auteur ne signale pas s'il produit de la mannite. Malgré la description incomplète, son caractère catalase positif suggère qu'il s'agit là d'un *Microbacterium* plus que d'un *Lactobacillus*.

En 1949, KVASNIKOV et ARYASHKINA (5) décrivent un ferment mannitique isolé de vins de dessert et qu'ils identifient à *L. buchneri* (HENNEBERG) BERGEY et AL.

En 1949, FORNACHON, DOUGLAS et VAUGHN (14) décrivent sous le nom de *L. trichodes* nov. sp. une bactérie isolée des vins de dessert de Californie. Cette espèce résiste à 20° d'alcool et forme dans les vins des amas cotonneux sans y produire de modifications chimiques importantes.

Les mêmes auteurs ont comparé cette espèce nouvellement décrite à celles formant ce que PEDERSON a appelé en 1938 le groupe inactif des *Lactobacilli*. Sont susceptibles de rentrer dans ce groupe les ferments hétérolactiques présentant les caractères suivants :

— décomposition de moins de substrats que les autres *Lactobacilli* ;
— difficulté de culture plus grande ;
— croissance plus lente même dans le milieu optimum.

Ils y ont classé :

L. fructivorans,
— *L. hilgardii*,
— *L. trichodes*,
L. type II de FORNACHON,
— *Betabacterium caucasicum*,
— *L. brevis*.

Position systématique de la bactérie isolée.

Tous les caractères concordent pour classer cette bactérie dans le genre *Lactobacillus* et dans les espèces du groupe hétérolactique, mais la bactérie ne correspond à aucune des quatre espèces retenues, comme ayant une existence certaine, dans la classification de BERGEY.

Ce microorganisme possède, d'autre part, tous les caractères du groupe inactif. Si l'on se réfère au tableau comparatif donné par VAUGHN, DOUGLAS et FORNACHON, il s'agirait du *Lactobacillus* type II FORNACHON qui n'a pas encore reçu de nom de genre. Au point de vue biochimique, la seule différence réside dans l'impossibilité que possède la bactérie nouvellement isolée de fermenter le maltose. Dans certaines conditions encore mal définies, cette bactérie est aussi capable de produire un polyoside soluble qui rend le vin filant. Nous ne pouvons savoir si c'est là un caractère spécifique ou une particularité due à la forme S du microbe.

En effet, bien que FORNACHON n'ait pas décrit de vin de dessert devenu filant, il signale une souche de son type IV qui rend les milieux liquides visqueux. Il n'attribue à ce caractère aucune importance pour sa classification. Comme, pour la bactérie que nous avons isolée, ce caractère ne se retrouve plus après passage sur milieu solide, nous n'en tenons pas compte pour la détermination de l'espèce.

Résumé.

On a observé et analysé un vin de liqueur ayant subi une évolution mannitique au cours de la conservation. Outre les modifications habituelles des acides lactique, acétique et malique, on a noté que le vin devenait visqueux, altération qui n'avait jamais été décrite dans ces vins. La viscosité est due à la présence d'un polyoside. La bactérie responsable a été isolée et décrite : il s'agit d'un *Lactobacillus* qui a été comparé aux espèces déjà décrites. On a souligné les différences morphologiques que présente la bactérie suivant le pH du milieu de culture.

Reçu pour publication le 24 *octobre* 1956.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) FÉVRIER (F.). — A new bacterial disease in wine. *Union of South Africa Department of Agriculture Journal*, **12**, 120-22, 1926.

(2) NIEHAUS (C. J. G.). — Mannitic bacteria in South African sweet wines. *Farming in South Africa*, **6**, 443-44, 1932.

(3) FORNACHON (J. C. M.). — A bacterium causing disease in fortified wine. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, **14**, 215-22, 1936.

(4) DOUGLAS, HOWARD (C.) et CRUESS (W.). — A note on the spoilage of sweet wine. *Fruit Products Journal*, **15**, 310, 1936.

(5) KVASNIKOV (E.) et ARYASHKINA (P.). — New (information) about the study of wine disease. *Vinodel. i Vinograd.*, **9**, 26-9 (1949). *C. Abstracts*, **48**, 14099.

(6) BERG (Y.) et KONDO (G.). — Cheminal caracteristics of wine affected by lactic acid souring. *Vinodel. i Vinograd.*, **10**, 31-33, 1950. *C. Abstracts*, **48**, 14101 h.

(7) Martin (L.). — Beitrag zur Kenntnis der linden Weine. — *Promotions Arbeit. Neographik,* Zurich 1948.

(8) Fornachon (J. C. M.). — Bacterial spoilage of fortified wines., *Australian wine board. Adelaide* 1943.

(9) Gayon (U.), Dubourg (E.). — Sur les vins mannites. *Ann. Inst. Pasteur,* **8**, 108-116 (1894).

(10) Gayon (U.), Dubourg (E.). — Nouvelles recherches sur le ferment mannitique. *Ann. Inst. Pasteur,* **15**, 526-69 (1901).

(11) Muller-Thurgau (H.) et Osterwalder (A.). — Die Bakterien in Wein und Obstwein und die dadurch verursachten Veranderungen. *Cent. B. f. Bakt II. Abt.,* **36**, 129-338, 1913.

(12) Muller-Thurgau (H.) et Osterwalder (A.). — Weitere Beiträge sur Kenntnis der Mannitbakterien in Wein. *Cent. B. f. Bakt. II, Abt.,* **48**, 1-35, 1918.

(13) Kayser (E.) et Manceau (E.). — Les ferments de la graisse des vins. Imprimerie H. Villers, Epernay, 1909.

(14) Fornachon (J.), Douglas (H.), Vaughn (R.). — Lactobacillus trichodes nov. spec. A bacterium causing spoilage in appetizer and dessert wines. *Hilgardia,* **19**, 129-133, 1949.

(15) Vaughn (R.), Douglas (H.), Fornachon (J.). — The taxonomy of Lact bacillus Hilgardii and related heterofermentative lactobacilli. *Hilgardia,* **19**, 134-9, 1949.

SUR LA SUBSTITUTION ÉVENTUELLE DE L'INVERSION DIASTASIQUE A L'INVERSION CHIMIQUE, DANS LE DOSAGE DU SACCHAROSE

PAR

Mme J. CHEREL-TOUCHEFEU et J. TAVERNIER
Station de Recherches pomologiques et cidricoles de Rennes.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

II. — Dosage classique d'un mélange de saccharose et de monoses, en technologie.

III. — Essais sur l'inversion du saccharose, par la sucrase.

a) Détermination du titre de la sucrase.
b) Influence du pH et de la température.
c) Influence de la concentration en diastase.
d) Influence de la concentration en saccharose.
e) Influence des sucres réducteurs.
f) Mutarotation.
g) Influence de la conservation.
h) Essais sur moûts de pommes.

IV. — Conclusions.

I. — INTRODUCTION

Chacun sait l'importance capitale que présente le dosage des sucres en technologie agricole et notamment en cidrerie dans les produits dérivés de la pomme : moûts de pommes, concentrés de moûts de pommes, jus de pommes et cidres.

La composition glucidique de la pomme est constituée par un mélange de trois sucres : le d-fructose, le d-glucose et le saccharose. Le premier, toujours dominant dans la pomme, représente 43 à 83 p. 100 des sucres totaux, les deux autres s'y rencontrant en quantité sensiblement égale, soit de 5 à 33 p. 100 des sucres totaux pour le glucose et de 4 à 46 p. 100 des sucres totaux pour le saccharose (1).

Le rapport $\frac{\text{glucose}}{\text{fructose}}$ n'étant jamais supérieur à 0,3 et le rapport $\frac{\text{saccharose}}{\text{sucres totaux}}$ étant toujours au plus égal à 0,25, pour les moûts de mélange d'après WARCOLLIER et LE MOAL (2-3), il est toujours intéressant d'effectuer le dosage séparé des trois sucres, à la fois par la méthode chimique et par polarimétrie, ce qui permet l'identification du jus et le dépistage éventuel d'un resucrage artificiel, par addition de glucose ou de saccharose.

La vente des cidres s'effectuant légalement d'après le degré alcoolique total, il est indispensable de doser les sucres des cidres sucrés, pour calculer l'alcool en puissance qui s'ajoute à l'alcool acquis, déterminé par distillation et aérométrie. Enfin, la détermination de l'extrait sec réduit ou désucré nécessite également un dosage rigoureux des sucres, dans les moûts et dans les cidres.

II. — DOSAGE CLASSIQUE D'UN MÉLANGE DE SACCHAROSE ET DE MONOSES EN TECHNOLOGIE

Le dosage quantitatif des sucres, soit par voie polarimétrique, soit par voie chimique n'étant exact que sur des solutions sucrées, débarrassées de tous autres corps étrangers, le moût ou le cidre doivent subir une défécation plombique, par addition d'un volume de sous-acétate de plomb de densité : 1,32, égal au 1/10 du volume de la boisson, prélevé pour l'analyse. Aucun entraînement de sucre n'est à craindre dans le précipité plombique formé (4).

Le dosage polarimétrique des sucres réducteurs est effectué par lecture de la déviation obtenue, à la lampe à vapeur de sodium (raie D) de la solution limpide et décolorée, séparée de son précipité plombique par filtration sur papier et remplissant un tube de 20 cm de longueur.

Pour effectuer le dosage chimique des sucres réducteurs, par la méthode classique de G. BERTRAND, la solution limpide et décolorée est débarrassée de son plomb en excès, par addition de bicarbonate ou de sulfate de soude en poudre, puis après dilution convenable pour effectuer le dosage, le plomb précipité est éliminé par filtration sur papier.

Le dosage polarimétrique et le dosage chimique des sucres totaux sont effectués après inversion du saccharose, obtenue par chauffage de la solution en présence d'un acide. Nous utilisons la technique de MUTTELET (5) : la liqueur déféquée et filtrée, additionnée de 1 p. 100 d'acide chlorhydrique pur est portée pendant 20 minutes dans un bain d'eau réglé à 75°, puis refroidie. Cette concentration en acide est suffisante pour assurer le dédoublement, par hydratation, du saccharose en quantités égales de fructose et de glucose, l'acide chlorhydrique jouant le rôle de catalyseur (6).

Le dosage polarimétrique est effectué dans les mêmes conditions que précédemment, directement sur la solution invertie, acide.

Le dosage chimique des sucres totaux sera effectué sur la solution invertie, après neutralisation exacte à la soude : le point précis de neutralisation est indiqué par l'insolubilisation des sels de plomb, le chlorure de plomb étant soluble en milieu acide et en milieu alcalin, sous forme de plombite de soude. Après dilution convenable, la solution bien agitée, est débarrassée du plomb précipité, puis utilisée pour le dosage.

Précisons que le point de neutralisation exact est indispensable à atteindre : le plus léger dépassement de la neutralité vers l'alcalinisation, indiqué par la solubilisation du plomb, provoquerait une altération du fructose et le dosage effectué conduirait à des résultats faux, inférieurs à la réalité.

III. — ESSAIS SUR L'INVERSION DU SACCHAROSE PAR LA SUCRASE

Il pourrait sembler intéressant de substituer, pour le dosage des sucres dans les dérivés de la pomme, l'inversion chimique par un acide, par l'inversion diastasique, à l'aide d'une sucrase. En effet, dans l'inversion chimique, la nature de l'acide, la concentration en acide, la température et le temps d'inversion sont autant de facteurs susceptibles de jouer sur l'hydrolyse du saccharose ; de plus la nécessité d'une neutralisation très précise de la solution invertie acide, pour permettre l'exécution correcte du dosage des sucres, est bien souvent la cause d'erreurs, si elle n'est pas effectuée avec toute la minutie désirable. A priori, l'inversion diastasique par la sucrase paraît plus séduisante : elle laisserait supposer plus de spécificité et de simplicité d'exécution, mais en consultant la littérature à ce sujet, on constate que cette méthode présente de sérieuses difficultés.

Néanmoins, nous avons tenu à vérifier par nous-mêmes les possibilités d'emploi de l'inversion diastasique du saccharose dans le dosage des sucres dans les dérivés de la pomme et sa substitution éventuelle, pour ce dosage à la méthode par inversion chimique.

Nos essais ont été effectués en utilisant deux préparations de sucrase, d'origine différente :

— une « Invertase » de la Société Rapidase à Seclin (Nord), sur support de glycérine aqueuse, spécialement préparée à notre attention [1] ;

— une « Invertin », de la firme Merck à Darmstadt, également en solution de glycérine aqueuse, produit commercial, fabriqué pour la biscuiterie et la confiserie.

[1] Nous adressons nos sincères remerciements à la Société la Rapidase qui a mis gracieusement à notre disposition cet échantillon, ce qui nous a permis de mener à bien ce travail.

a) Détermination du titre de la sucrase.

Le titre de ces deux sucrases a été déterminé suivant la méthode utilisée par la Société La Rapidase :

9 ml d'une solution aqueuse de saccharose pur, à la concentration de 22 p. 100 sont introduits dans un ballon jaugé de 100 ml, puis additionnés de 1 ml, de la solution diastasique aqueuse à la concentration de 2 p. 100. Porter au bain d'eau réglé à la température de 55°, à l'aide d'un thermostat, pendant 1 heure. Détruire ensuite l'activité diastasique par chauffage, en portant la solution invertie dans un bain d'eau à l'ébullition, pendant 10 minutes. Refroidir, compléter à 100 ml et procéder au dosage du sucre inverti par la méthode de G. BERTRAND, suivant les conditions prescrites.

Le titre de la diastase correspond à la quantité de saccharose, exprimée en grammes, invertie par 1 gramme de diastase, suivant le processus ci-dessus.

Les titres obtenus sont les suivants :

Titre de l'invertase La Rapidase : 21.

Titre de l'invertine Merck : 86.

La diastase allemande présente donc une activité quatre fois plus forte que celle de fabrication française.

b) Influence du pH et de la température.

Si on mesure le pouvoir d'action d'une diastase par la quantité de matière qu'elle est capable de transformer dans un temps donné, on constate que de faibles variations du pH peuvent se répercuter très fortement sur les résultats obtenus.

D'après THOMAS (7), le pH optimum de la sucrase serait de 4,2, mais cet auteur fait remarquer que « le pH optimum d'un ferment n'a de valeur que pour une préparation déterminée, dans des conditions réactionnelles bien connues ; en particulier, le pH optimum d'un ferment agissant dans son milieu physiologique est tout différent de celui du même ferment isolé à l'état de pureté ».

D'après Van LAER (8), « le pH optimum de la sucrase est généralement de 5, la température la plus favorable à l'action de l'enzyme est de 52° ; à 60° les solutions perdent en une heure, la moitié de leur pouvoir diastasique ; à 70°, la destruction devient très rapide ».

Nous avons étudié l'action du pH sur ces deux sucrases en prenant comme base inférieure le pH maximum des cidres, soit 4,2. Ces déterminations ont été effectuées en tamponnant à des pH différents, 20 ml d'une solution de saccharose à 5 p. 100, l'inversion étant effectuée pendant 1 heure à 55°. Les résultats sont consignés dans le tableau I.

TABLEAU I

Action du pH sur l'activité des sucrases.

p H.	p. 100 de saccharose inverti par 5 ml de solution invertase La Rapidase à 1 p. 100	p. 100 de saccharose inverti par 1 ml de solution invertine Merck à 1 p. 100
4,2	71	76,8
5,28	69,6	75,4
5,9	63,2	69,6
7	55,2	41,8

L'activité la plus grande pour ces deux sucrases se situe donc à 4,2.

Des essais entrepris pour déterminer la température la plus favorable à l'action de ces enzymes, nous ont permis de la fixer à 55°, pour les deux.

c) **Influence de la concentration en diastase.**

Le titre de ces diastases étant déterminé, il semblerait à priori, qu'il soit possible d'en déduire, par un simple calcul la quantité de diastase nécessaire pour invertir en totalité le saccharose de solutions de concentrations différentes, mais connues. En réalité, il n'en est rien, car la quantité de saccharose inverti n'est pas proportionnelle à la quantité de sucrase mise en œuvre, les produits formés, glucose et fructose, déplaçant l'équilibre en ralentissant la vitesse du dédoublement.

L'essai résumé dans le tableau II suivant, effectué avec l'invertine Merck, démontre ce fait clairement, les températures et les temps d'inversion étant tous les mêmes.

TABLEAU II

Solution d'invertine Merck à 2 p. 100 ml de solution utilisés	10 ml solution saccharose 15 p. 100 p. 100 de saccharose inverti
1	73
2	90
3	100

L'inversion totale du saccharose mis en œuvre n'a été obtenue qu'en triplant la quantité de diastase calculée d'après son titre.

d) **Influence de la concentration en saccharose.**

Dans les actions diastasiques, on constate habituellement qu'au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration du substrat, la vitesse réactionnelle augmente de moins en moins vite et la proportionnalité disparaît.

Nous avons vérifié cette action de la concentration, en utilisant des

solutions de saccharose de concentration croissante : 10, 15, 20, 22 et 25 p. 100.

Des prises de 10 ml de chacune de ces solutions, additionnées de 1 ml de la solution d'invertine Merck à 2 p. 100, ont été portées au bain d'eau réglé à 55°, pendant 1 heure. Après inactivation de la diastase, les sucres réducteurs formés ont été dosés.

Les résultats consignés dans le tableau III, sont les suivants :

TABLEAU III

Solutions de saccharose en p. 100	Milligrammes de saccharose inverti
10	707,5
15	927,5
20	997,5
22	805,0
25	862,5

On constate donc, que jusqu'à une concentration en saccharose de 20 p. 100, celle-ci parait favoriser l'activité diastasique. Par contre au-dessus de cette concentration, l'activité de la diastase paraît décroître.

Une autre série d'essais a été effectuée en utilisant des solutions de saccharose à des concentrations différentes de 10, 15, et 20 p. 100, les quantités de diastase utilisées pour l'inversion, étant calculées proportionnellement aux concentrations en saccharose. Les résultats obtenus en suivant la marche progressive de l'inversion, sont rassemblés dans le tableau IV.

TABLEAU IV

Solution de saccharose en p. 100	p. 100 de saccharose inverti			
	en 1/4 d'heure	en 1/2 heure	en 3/4 d'heure	en 1 heure
10	29,2	52,25	68,75	76,2
15	25,6	40,6	66,5	73,1
20	34,5	49,8	63,5	71,0

L'examen de ces chiffres permet de tirer les conclusions suivantes :

— quelle que soit la concentration en saccharose, la vitesse d'inversion décroît avec le temps.

— la vitesse d'inversion est plus rapide, au début de l'action diastasique (premier 1/4 d'heure), dans les solutions à forte concentration, que dans celles à concentration plus faible.

— la vitesse d'inversion décroît ensuite avec le temps, et ce d'autant plus, que la concentration en saccharose est plus élevée.

Ces faits s'expliquent par le fait que des complexes d'absorption se forment entre la diastase et les produits libérés par son action. Diminuant

de ce fait la concentration, ces complexes peuvent être considérés comme des paralysants. La sucrase possédant des affinités partielles pour le fructose et le glucose, cette action retardatrice s'expliquerait par la formation de complexes d'absorption avec ces sucres. En solutions concentrées, se superpose à cette action, la viscosité qui agit comme agent perturbateur, le colloïde diastasique se trouvant plus ou moins rapidement paralysé par une augmentation sensible de la viscosité du milieu.

e) **Influence des sucres réducteurs.**

Il a été démontré depuis longtemps, que l'addition de sucre réducteur à une solution de saccharose traitée par la sucrase, provoquerait une diminution sensible de la vitesse d'hydrolyse de ce sucre par la diastase en action.

Nous avons vérifié ce fait en étudiant l'action soit du glucose seul, soit du fructose seul, soit du mélange glucose + fructose, sur une solution de saccharose hydrolysée par l'invertine Merck.

L'addition volontaire de 10 p. 100 de glucose dans une solution de saccharose à 5 p. 100, traitée par la sucrase, provoque un ralentissement net de la vitesse d'inversion qui, dans ces conditions, exige une durée d'1/4 d'heure supplémentaire, par rapport à un témoin à la même concentration en saccharose, mais non additionné de glucose.

L'addition volontaire de 10 p. 100 de fructose, effectuée dans les mêmes conditions que précédemment, est encore plus marquante, car le retard apporté dans l'inversion se chiffre à 1 heure.

Enfin, l'addition de 5 p. 100 de glucose et de 5 p. 100 de fructose n'a prolongé la durée d'inversion que de 1/4 d'heure.

Notons également que le retard apporté dans l'hydrolyse du saccharose par le glucose, le fructose et également par le galactose, serait variable, suivant l'origine de la sucrase utilisée, d'après M^{me} de GRANDCHAMP-CHAUDIN et Coll. (9).

La sucrase détachant une molécule de fructose furanosique des di-, tri- et tétrasaccharides qui en renferment, sans toucher au reste du sucre, attaque non seulement le saccharose, mais également le raffinose, le gentianose et le stachyose.

Par contre, la sucrase extraite non plus de la levure, mais d'une moisissure (Aspergillus oryzae), serait sans action sur le raffinose et le gentianose, mais attaquerait par contre le mélécitose. Dans ces conditions, l'insuffisance de la spécificité de la sucrase est un obstacle à son emploi pour le dosage des sucres, en technologie végétale.

f) **Mutarotation.**

Il est admis que l'inversion du saccharose par la sucrase ne s'effectue pas de la même façon que par hydrolyse avec un acide. Par hydro-

lyse chimique, la mutarotation des monoses libérés serait supprimée instantanément grâce à la présence de l'acide utilisé, tandis que par inversion diastasique, le phénomène de mutarotation se présenterait : il conviendrait donc, dans ce cas, de prendre soin de supprimer cette mutarotation, en portant le liquide à l'ébullition par exemple ou par acidification, avant d'effectuer des dosages au polarimétre.

Nous avons tenté de vérifier ce phénomène, mais en prenant les précautions indispensables suivantes :

— les solutions de saccharose destinées à être passées au polarimètre, après action de la sucrase, ont subi une inversion totale : en effet, nous ne pouvions pas porter la solution invertie à l'ébullition pour inactiver la sucrase, sous peine de supprimer le phénomène de mutarotation et d'autre part, nous devions nous assurer que les différences de déviation qui pourraient être constatées, n'étaient pas imputables à une prolongation de l'action diastasique sur le saccharose restant, si celui-ci n'avait pas été hydrolysé en totalité, au cours de l'inversion.

— l'inversion diastasique a toujours été conduite en milieu neutre, un pH acide ou basique annihilant la mutarotation.

Nos essais ont été répétés plusieurs fois, suivant les conditions ci-dessus et dans aucun cas, le phénomène de mutarotation n'a pu être mis en évidence.

g) **Influence de la conservation.**

Bien que la glycérine aqueuse n'ait qu'une faible action sur les diastases, on constate qu'après quelques mois de conservation, même à basse température (+6°), l'activité des préparations diastasiques diminue sensiblement.

Après quelques mois de conservation, dans les conditions exposées ci-dessus, nous avons déterminé à nouveau le titre des deux préparations diastasiques utilisées pour ces essais, selon la méthode précédemment décrite :

	Invertase La Rapidase	Invertine Merck
Titre primitif	21	86
Nouveau titre.....	17	51

L'activité diastasique a donc diminué très nettement de 19 p. 100 pour la sucrase française et de 40 p. 100 pour le produit allemand. Le vieillissement de la diastase apporterait donc une difficulté supplémentaire d'emploi pour un laboratoire d'analyses.

h) **Essais sur moûts de pommes.**

Bien que nos essais sur solution pure de saccharose additionnée ou non de sucres réducteurs ne nous ait pas permis d'établir un protocole

précis d'inversion du saccharose, par voie diastasique, nous avons entrepris quelques essais de dosage du saccharose dans les moûts de pommes naturels et dans des moûts reconstitués par dilution de moûts concentrés de pommes, de fabrication industrielle. Toutes nos tentatives de dosage rationnel ont échoué : même des quantités beaucoup plus importantes de sucrase et la prolongation exagérée du temps d'inversion ne conduisent qu'à des résultats incertains, exigeant un travail beaucoup plus délicat à conduire et d'un temps d'exécution beaucoup plus long.

Par ailleurs, l'inversion diastasique devrait être effectuée avant défécation plombique, le plomb devant être considéré comme un paralysant ou un inhibiteur de la sucrase.

De plus, du fait de sa teneur variable en colloïdes, pectines, albuminoïdes, polypeptides, les moûts de pommes sont plus ou moins visqueux et cette viscosité paralyse également l'action diastasique, sans parler de l'action propre possible, de chacun de ces colloïdes.

IV. — CONCLUSIONS

Ce travail nous permet donc de conclure que seule la méthode d'inversion chimique du saccharose par un acide, est valable pour doser correctement cet ose et les autres sucres réducteurs en mélange, notamment le fructose et le glucose, à la fois par la méthode polarimétrique et par la méthode chimique classique de G. Bertrand, dans les produits rencontrés couramment en technologie.

La détermination du saccharose, par inversion diastasique reste une méthode de travail plus qualitative que quantitative, susceptible de rendre des services, notamment en chimie biologique, pour rechercher des quantités relativement réduites de ce diholoside.

Reçu pour publication le 24 octobre 1956.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Tavernier (J.) et Jacquin (P.). — Qualité des pommes et des poires en fonction des variétés. *Ann. Nutrit. Aliment.*, 1955, IX, 5-6, pp. A 143-A 171.

(2) Warcollier (G.). — Les cidres resucrés par addition de saccharose ou de glucose. *Ann. Falsif. Fraud.*, 1909, **12**, p. 425.

(3) Warcollier (G.) et Le Moal (A.). — Variations des proportions relatives du saccharose, du glucose et du lévulose dans les jus de pommes pendant la fermentation alcoolique. *Ann. Falsif. Fraud.*, 1935, 323, p. 517.

(4) Tavernier (J.) et Jacquin (P.). — La défécation des moûts de pommes et des cidres pour le dosage chimique ou polarimétrique des sucres. *Ind. Agric. Aliment.*, 1948, 10-12, pp. 305-308.

(5) Muttelet (O. F.). — Dosage des sucres dans les produits alimentaires. *Ann. Falsif. Fraud.*, 1913, 53, p. 138.

(6) Sabatier (P.). — La catalyse en chimie organique. — Béranger éd. Paris, 1913, p. 15.

(7) Thomas (P.). — Manuel de Biochimie, Masson et Cie, Paris 1946, 2e édition, p. 180.

(8) Van Laer (M. H.). — La chimie des fermentations, Desoer, Liège, 1949, 2e édition, **1**, p. 190.

(9) de Grandchamp-Chaudun (Andrée), Moreau (Marie-Thérèse). — Sur l'hydrolyse diastasique du saccharose : influence du glucose, du galactose, du fructose sur la vitesse d'inversion. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **235**, 10, p. 552-554.

de Grandchamp-Chaudun (Andrée), Bergeret (Bernadette) et Chatagner (Fernande). — Etude comparée de l'hydrolyse du saccharose et de l'hydrolyse faible du raffinose par différentes saccharases. *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **236**, 13, p. 1379-1381.

Le Directeur-Gérant : B. Laclavière.

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 13-3-1957.

Dépôt légal : 1er trimestre 1957 *N° d'impression : 398*

MISE EN ÉVIDENCE DES STREPTOCOQUES LACTIQUES INHIBITEURS ET STIMULANTS DANS LE LAIT ET LES FROMAGES

FRÉQUENCE DE CES STREPTOCOQUES DANS LE LAIT CRU ET LES FROMAGES FERMIERS PRODUITS DANS DIFFÉRENTES RÉGIONS DE FRANCE

PAR

R. CHEVALIER (*), Jeanne FOURNAUD, Elisabeth LEFEBVRE et G. MOCQUOT

Station centrale de Microbiologie et Recherches laitières
Jouy-en-Josas

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

II. — Premières méthodes utilisées pour déceler et isoler les streptocoques lactiques producteurs de substances inhibitrices.

III. — Nouvelle méthode proposée.

1. — Principe.
2. — Choix d'une souche de lactobacille comme organisme test.
3. — Choix du milieu de culture.
4. — Recherche des conditions optima de températures et durées d'incubation pour la formation des zones d'inhibition.
5. — Etude de la proportion de colonies de streptocoques susceptibles de cultiver après repiquage.
6. — Zones d'inhibition et zones de stimulation du lactobacille.
7. — Technique proposée pour l'isolement des streptocoques inhibiteurs.

IV. — Application de la méthode à l'étude d'échantillons de lait cru et de fromage.

1. — Origine des échantillons.
2. — Résultats.

Résumé.

(*) Adresse actuelle : Maître de Conférences à l'Institut National Agronomique, 9, rue de l'Arbalète, Paris.

I. — INTRODUCTION

L'équilibre qui s'établit entre les espèces microbiennes qui constituent la flore du lait fait depuis de longues années l'objet de nombreux travaux d'intérêt théorique et pratique.

En 1928, ROGERS (1) a signalé que des streptocoques lactiques peuvent inhiber le développement d'autres streptocoques lactiques et de *Lactobacillus bulgaricus*. En 1933, WHITEHEAD (2) en Nouvelle-Zélande a trouvé, dans des échantillons de lait de vache, des streptocoques inhibiteurs pour d'autres bactéries lactiques. A partir de certains laits de mélange, WHITEHEAD et RIDDET (3) ont isolé un organisme susceptible de provoquer une inhibition de l'acidification au cours de la fabrication du fromage. MEANWELL (4), en Angleterre, a fait des observations identiques. COX et WHITEHEAD (5) examinant des échantillons prélevés journellement pendant toute l'année sur le lait de mélange d'un troupeau d'une centaine de vaches, ont trouvé des organismes inhibiteurs dans 17,8 p. 100 des échantillons.

HOYLE et NICHOLS (6) ont étudié les streptocoques lactiques entrant dans la constitution des levains. Parmi 276 souches examinées, ces auteurs en ont trouvé 78 qui produisaient une substance inhibant le développement d'autres streptocoques lactiques. Sur 220 souches de *Streptococcus cremoris* provenant de 13 levains commerciaux, 59 (27 p. 100) étaient inhibitrices et parmi 56 souches isolées de 8 échantillons de lait acide et classées comme *Streptococcus lactis*, 19 (34 p. 100) étaient également inhibitrices. Les auteurs font remarquer que certaines des souches inhibitrices ainsi isolées pouvaient être identiques car plusieurs d'entre elles provenaient d'un même échantillon de levain commercial ou de lait en voie d'acidification.

HIRSCH et WHEATER (7) ont fait porter leurs travaux sur près de 10 000 échantillons provenant de différentes sources : lait cru (1069) et pasteurisé (618), fromage (702), selles humaines, bovines et porcines, contenu de panse de bovins, enfin prélèvements du nez et de la gorge chez l'homme. Ils ont trouvé 56 cultures inhibitrices, dont 28 donnant un taux d'inhibition faible appartenaient en majorité à l'espèce *Streptococcus faecalis*.

Les 24 autres cultures classées comme *Str. lactis*, provenaient d'échantillons de lait ou de produits laitiers (12) ; de prélèvements effectués sur l'homme dans le nez et la gorge (10), de selles humaines (2).

BARIBO et FOSTER (8) ont étudié neuf souches de *Str. lactis*, une souche de *Str. cremoris* et trois cultures provenant de levains commerciaux. Ils ont trouvé qu'elles produisaient une substance thermostable qui inhibe la croissance de *Lactobacillus casei*, ainsi que celles

d'autres streptocoques lactiques, ces derniers étant cependant moins inhibés que le lactobacille.

On doit signaler enfin les travaux de Kooy et Pette (9) en Hollande qui ont également examiné des échantillons provenant de différentes sources. Ils ont trouvé des streptocoques inhibiteurs dans les proportions suivantes :

— 1 souche inhibitrice sur 95 souches isolées de 50 fromages ;

— 3 souches inhibitrices sur 165 cultures provenant de 51 échantillons de lait cru ;

— 7 souches inhibitrices sur 30 souches de streptocoques acidifiant le lait, isolées à partir de 28 fèces.

Après avoir montré avec Hirsch (10) que la nisine produite par certaines souches de *Str. lactis* inhibe le développement de beaucoup d'autres microorganismes que les bactéries lactiques, en particulier les Clostridia, Mattick (11) a pensé que cette substance inhibitrice pourrait trouver des applications pratiques dans la fabrication des fromages en permettant de lutter contre les accidents de gonflement dus aux anaérobies. Des travaux dans cette direction ont été déjà réalisés en Angleterre (12), en France (13), en Hollande (14).

Les recherches que nous poursuivons sur les applications possibles de ces bactéries inhibitrices en fromagerie nous ont conduit à constituer une collection de souches productrices de nisine. Dans le présent article, nous décrivons la méthode simple qui a été mise au point pour faciliter l'isolement de ces souches et nous donnons les résultats observés en appliquant la méthode à l'étude d'échantillons de lait cru et de fromages provenant de différentes régions de France.

II. — PREMIÈRES MÉTHODES UTILISÉES POUR DÉCELER ET ISOLER LES STREPTOCOQUES LACTIQUES PRODUCTEURS DE SUBSTANCES INHIBITRICES

Pour rechercher les streptocoques inhibiteurs dans des échantillons de lait, Cox et Whitehead (5) ont utilisé la méthode connue sous le nom « d'épreuve de vitalité » (« vitality test ») ainsi que l'épreuve au bleu de méthylène mise au point par Cox (15). Cette dernière épreuve, qui est d'un emploi facile, permet d'examiner en même temps un grand nombre d'échantillons. Pour mettre en évidence les quelques germes inhibiteurs présents dans des échantillons de lait fraîchement récolté, il est nécessaire de procéder d'abord à un enrichissement en incubant les échantillons à 30° jusqu'à coagulation afin d'obtenir une quantité de substance inhibitrice suffisante pour être décelable. Une partie de la culture coagulée est ajoutée à du lait normal et, après pasteurisation et ensemencement, l'inhibition est décelée par un retard dans l'acidification

(« vitality test ») ou par un retard dans la réduction d'un colorant (épreuve du bleu de méthylène) en comparant chaque fois avec un témoin pasteurisé et ensemencé dans les mêmes conditions.

Pour déceler et isoler les streptocoques lactiques producteurs de substances inhibitrices, on peut également procéder à des isolements sur gélose à partir des échantillons de lait soumis aux examens en utilisant les techniques classiques. On repique, en les prélevant au hasard, un grand nombre de colonies. Les cultures obtenues sont ensuite inoculées — soit directement, soit après traitement convenable qui permet de détruire les cellules microbiennes sans altérer la substance inhibitrice — dans du lait ensemencé avec une autre bactérie lactique sensible et choisie comme organisme test. Les cultures qui produisent un retard dans la formation d'acide lactique par l'organisme test sont considérées comme inhibitrices.

L'emploi de techniques spécialement adaptées à la recherche des micro-organismes producteurs d'antibiotiques a constitué un progrès important. Ces techniques permettent en effet de repérer directement les colonies inhibitrices parmi toutes les colonies isolées sur milieu gélosé en boites de Petri.

C'est ainsi que HIRSCH et WHEATER (7) ont utilisé pour une partie de leurs travaux une modification de la technique de KELNER (16). Elle consiste à employer trois couches stratifiées de milieu gélosé. Une première couche est ensemencée avec une dilution convenable de l'échantillon à examiner de façon à obtenir 50 à 100 colonies séparées. Une deuxième couche (4 ml de milieu gélosé) est ensuite coulée sur la première et les boîtes de Petri sont incubées à 37° pendant la nuit. Une troisième couche de milieu gélosé, ensemencée avec *Streptococcus agalactiae* comme organisme test, est enfin coulée à la surface de la deuxième couche et les boîtes de Petri sont de nouveau mises à incuber à 37° pendant 24 heures. Au bout de ce temps, *Str. agalactiae* s'est développé dans la gélose et a rendu le milieu opaque. On observe alors que certaines des colonies de streptocoques lactiques qui ont poussé dans la première couche sont auréolées d'une zone claire dans laquelle *Str. agalactiae* ne s'est pas développé : on repique ces colonies sur bouillon, et on les éprouve par une méthode de dilution pour confirmer leurs propriétés inhibitrices.

L'interposition d'une couche médiane de milieu gélosé réduit, d'après les auteurs, l'effet inhibiteur de l'acide lactique et la possibilité de formation d'eau oxygénée par les colonies développées dans la première couche. Elle évite ainsi de confondre l'action inhibitrice de ces substances avec celles des antibiotiques. Elle permet en revanche de mettre en évidence l'action des antibiotiques même lorsqu'ils diffusent lentement comme la nisine.

HIRSCH, MCCLINTOCK et MOCQUOT (17) ont utilisé une technique un

peu différente pour rechercher les streptocoques inhibiteurs. Une dilution de l'échantillon examiné, calculée pour obtenir le développement d'une trentaine de colonies, est ensemencée par étalement à la surface d'un milieu gélosé préalablement coulé en boîte de Petri. La composition du milieu (milieu Y. G. A. des auteurs) est la suivante :

Yeastrel	: 0,3 p. 100
Lab Lemco	: 0,5 p. 100
Peptone Evans	: 0,3 p. 100
Glucose	: 1,0 p. 100
Gélose	: 2,0 p. 100

Le milieu est rendu sélectif pour les streptocoques en ajoutant 0,05 p. 100 d'acétate de thallium.

Les boîtes de Petri sont d'abord incubées à 30° pour permettre le développement des streptocoques lactiques. On coule ensuite dans les boîtes une deuxième couche constituée par de la gélose nutritive (N. A.) ensemencée à la dose de 1 p. 100 avec une dilution au 1/100 d'une culture de 48 heures à 37°, sur bouillon nutritif, de *Staphylococcus aureus* utilisé comme organisme test. Avant l'ensemencement du staphylocoque, on ajoute au milieu une quantité convenable d'une solution de phosphate à 50 p. 100 stérilisée par filtration, de manière à obtenir une concentration en phosphate de 1 p. 100 dans le milieu. Le phosphate en tamponnant le milieu, évite la formation de zones d'inhibition dues à la production d'acide lactique par les colonies de streptocoques.

Les boîtes de Petri sont alors conservées à la glacière pendant 24 heures pour permettre aux substances antibiotiques produites dans la première couche de milieu de diffuser vers la deuxième couche qui contient l'organisme test. Puis les boîtes sont soumises à une incubation de 24 heures à 37° qui favorise le développement du staphylocoque sauf dans la zone qui entoure les colonies productrices de substances antibiotiques.

Cette technique est l'une de celles que nous avons d'abord utilisées en lui apportant les légères modifications suivantes :

a) Les deux couches stratifiées sont préparées avec le même milieu (milieu Y. G. A.).

b) L'organisme test est le *Str. cremoris* (1 P 5) inoculé à la dose de 1 p. 100 d'une dilution à 10 p. 100, préparée elle-même à partir d'une culture sur lait de 24 heures à 22°. En effet, il nous a paru plus indiqué d'employer un streptocoque lactique comme organisme test pour des travaux orientés vers des applications en laiterie. De plus la souche 1 P 5 est celle que nous utilisons pour vérifier par culture en milieu liquide (sur lait tournesolé) la production des substances inhibitrices et pour doser ces dernières.

La méthode peut donner de bons résultats mais présente cependant quelques inconvénients : tout d'abord elle se révèle assez longue dans

l'application pratique lorsqu'on veut étudier un grand nombre d'échantillons ; ensuite on observe fréquemment qu'un certain nombre de germes provenant de colonies développées sur la première couche sont entraînés dans la seconde au moment où celle-ci est coulée sur la première. Ces germes donnent naissance à de nouvelles colonies qui rendent les observations, dénombrements et repiquages difficiles.

III. — NOUVELLE MÉTHODE PROPOSÉE

1. — Principe.

On met à profit la différence qui sépare les zones de températures favorables au développement de deux types de germes : d'une part les streptocoques lactiques que l'on veut étudier et d'autre part une souche de lactobacille utilisée comme organisme test.

La méthode consiste à ensemencer, en milieu gélosé, une dilution convenable de l'échantillon à examiner de façon à obtenir des colonies séparées de streptocoques lactiques et à inoculer en même temps, dans le même milieu, une suspension d'un lactobacille thermophile.

On incube d'abord les boîtes à température relativement basse (20° environ) : seuls les streptocoques poussent. S'ils produisent des substances inhibitrices ou stimulantes, celles-ci ont le temps de diffuser dans la gélose même lorsqu'il s'agit de grosses molécules, comme c'est le cas pour la nisine.

On porte ensuite les boîtes à plus haute température et le lactobacille se développe en « révélant » par des zones de croissance plus fortes, ou au contraire plus faibles ou nulles, autour de certaines colonies de streptocoques, la présence de substances stimulantes ou inhibitrices.

2. — Choix d'une souche de lactobacille comme organisme test.

Pour choisir une souche de lactobacille pouvant convenir comme organisme test nous nous sommes basés sur deux épreuves : 1) sensibilité à la nisine, 2) non développement à une température égale ou inférieure à 30°.

Dans un essai préliminaire nous avons examiné 12 souches de lactobacilles : 2 provenant de la collection de la Station de Recherches laitières de Poligny (Jura) et 10 isolées des produits suivants : Yoghourt :3 ; macération de caillettes : 6 ; salive humaine : 1.

La sensibilité à la nisine a été mesurée en utilisant comme source de nisine le sérum d'une culture sur lait de *Str. lactis*, souche F4 de notre collection. On a comparé les résultats des dosages effectués sur ce sérum par la méthode des dilutions en utilisant tour à tour chaque souche de lactobacille comme organisme test.

Pour mesurer la vitesse de développement des lactobacilles à 30°, nous avons suivi le pH d'une culture de chaque lactobacille ensemencé sur lait stérilisé par passage à l'autoclave.

Nous avons finalement retenu une souche LY3, isolée d'un Yoghourt, qui a été identifiée selon BRIGGS (18) comme appartenant à l'espèce *Lactobacillus lactis*. Elle se développe relativement vite à 30° et s'est révélée comme la plus sensible à la nisine : sa croissance est inhibée pendant 15 heures à 37° par une dilution à 1/640 du sérum de la culture de streptocoque inhibiteur ce qui correspond, en comparant avec une solution de nisine pure, à 0,6 unité Reading de nisine/ml. Cette souche LY3 a été retenue pour tous les essais réalisés au cours de ce travail.

3. — Choix du milieu de culture.

Nous avons utilisé le milieu additionné de jus de tomate et glucose que BRIGGS (18) a mis au point pour la culture des lactobacilles. Sous forme de bouillon ce milieu nous a servi pour l'entretien de la souche test LY3 : une culture de 15 heures à 37° de cet organisme a toujours été utilisée pour les essais que nous décrivons dans ce travail.

Nous nous sommes assurés que ce même milieu gélosé convient également bien pour la culture des streptocoques lactiques et que le développement de ces derniers n'est pas gêné par celui du lactobacille. Ceci ressort du résultat des dénombrements que nous avons effectués : ils ont porté d'une part sur la souche F4 de streptocoque inhibiteur, d'autre part sur un échantillon de lait cru (P8). Deux ensemencements ont été faits en parallèle, en présence et en l'absence de l'organisme test. Ce dernier a été utilisé à la dose de 1 p. 100 (essai portant sur la souche F4) ou 0,1 p. 100 (essai de l'échantillon de lait cru P8). Dans les deux cas les boîtes de Petri ont été incubées pendant 24 heures à 30°, puis 24 heures à 37° avant d'effectuer la numération des colonies de streptocoques. Les chiffres du tableau I montrent que le nombre de colonies de streptocoques développées est pratiquement le même en présence ou en l'absence des lactobacilles.

TABLEAU I

Développement des colonies de streptocoques lactiques sur le milieu gélosé de Briggs, ensemencé ou non, avec Lactobacillus lactis *LY3*

		Nombre de colonies de Streptocoques
Souche inhibitrice (F4)	sans LY3	87×10^7
	avec LY3 (1 p. 100)	80×10^7
Échantillon de lait cru (P8)	sans LY3	40×10^2
	avec LY3 (0,1 p. 100)	38×10^2

Le fait d'ensemencer en même temps, et dans la masse du milieu gélosé, les streptocoques et le lactobacille nous avait conduit à penser qu'il serait peut-être nécessaire de tamponner le milieu avec 1 p. 100 de phosphate, comme le faisaient HIRSCH, MCCLINTOCK et MOCQUOT (17) pour éviter les interférences dues à la production d'acide lactique par les streptocoques.

L'essai suivant nous a montré qu'il n'est pas indiqué de tamponner le milieu. Deux séries de boîtes de Petri ont été ensemencées avec le streptocoque inhibiteur F4 et 1 p. 100 de la souche test LY3 : une des séries seulement recevait du phosphate. Les boîtes ont été ensuite incubées 24 heures à 30° puis 24 heures à 37°, avec ou sans séjour de 24 heures à la glacière entre les deux incubations.

Nous avons observé la formation de zones d'inhibition peu nettes en présence de phosphate par suite d'un mauvais développement du lactobacille, tandis qu'on obtenait de très belles zones d'inhibition en l'absence de phosphate.

D'autre part, nous avons pu vérifier que des streptocoques produisant des doses d'acide lactique égales à celles des streptocoques inhibiteurs — c'est le cas par exemple de *Str. cremoris* I P5 — ne donnaient pas de zones d'inhibition lorsqu'on les cultive sur un milieu sans phosphate.

4. — Recherche des conditions optima de températures et durées d'incubation pour la formation des zones d'inhibition.

Nous avons ensemencé une série de boîtes de Petri avec une même dose de la souche inhibitrice F4, calculée pour obtenir des colonies bien isolées, et une même dose (1 p. 100) de l'organisme test LY3. Le contenu (20 ml) d'un tube de milieu de BRIGGS gélosé et stérile a été coulé aussitôt après dans chaque boîte. Celles-ci ont été placées successivement et pendant une durée variable à différentes températures. Les combinaisons température-temps qui ont été étudiées sont les suivantes :

a) *Incubation initiale*, température : 15°, 22° ou 30° ; durée 24, 48 ou 72 heures. A 30° nous avons également étudié des durées d'incubation de 14, 17 et 20 heures.

b) *Incubation finale*, température : 30° et 37° ; durée 24 ou 48 heures. Dans quelques cas l'incubation finale commencée à 30° a été terminée à 37°.

c) L'incubation initiale et l'incubation finale ont été séparées ou non par un séjour de 24 heures à la glacière (+ 5°).

d) Enfin pour 4 combinaisons, nous n'avons fait qu'une seule incubation limitée à 24 ou 48 heures soit à 22°, soit à 30°.

Au total 75 combinaisons différentes comportant des séjours successifs à 15°, 22°, 30° ou 37°, avec ou sans passage intermédiaire à la glacière ont été ainsi étudiées.

Résultats

Avec 19 combinaisons nous n'avons pas obtenu de zones d'inhibition par suite du mauvais développement de l'organisme test. Ceci s'observe quand on procède à une seule incubation limitée à 24 heures à la température de 22° ou 30°, ou quand la durée d'incubation finale à 30° n'est que de 24 heures.

D'autre part, le développement du lactobacille au cours d'une incubation finale à 30° est toujours fortement retardé quand l'incubation initiale, réalisée à une température inférieure à 30° a été longue.

Parmi les 56 combinaisons avec lesquelles nous avons observé des zones d'inhibition, le diamètre de ces zones variait, suivant la combinaison adoptée, de 8 à 40 mm.

A titre d'exemple, nous avons observé des zones d'inhibition de :

— 8 mm pour la combinaison comportant une incubation initiale de 14 heures à 30°, suivie d'un séjour de 24 heures à la glacière et d'une incubation finale de 24 heures à 37°.

— 40 mm pour la combinaison comportant : une incubation initiale de 48 heures à 22° puis de 24 heures à 30°, un séjour de 24 heures à la glacière, puis une incubation finale de 24 heures à 37°.

Un allongement de l'incubation initiale à 22° et un séjour intermédiaire à la glacière pendant 24 heures permettent l'un et l'autre d'augmenter le diamètre des zones d'inhibition, mais les colonies du lactobacille sont plus clairsemées et la bordure des zones d'inhibition est par conséquent moins nette qu'avec une durée d'incubation initiale plus courte.

D'autre part, il n'est pas intéressant, pratiquement, d'obtenir des zones d'inhibition de trop grand diamètre car la présence d'un nombre, même faible, de colonies inhibitrices sur une boîte de Petri suffit alors à empêcher l'observation des zones : la croissance du lactobacille est en effet complètement inhibée ou limitée seulement à quelques plages peu étendues. Même si ce phénomène est moins marqué, les zones d'inhibition peuvent encore chevaucher l'une sur l'autre, ou bien une seule zone d'inhibition peut englober plusieurs colonies parmi lesquelles il est parfois difficile de distinguer celle qui est responsable de l'inhibition.On observe donc en général que le dénombrement des colonies inhibitrices est aléatoire ou impossible lorsque le diamètre des zones d'inhibition devient trop grand.

Enfin la méthode, pour rester simple, ne doit pas être alourdie par des incubations trop longues.

Après avoir examiné tous les résultats, et tenant compte des considérations exposées ci-dessus, nous avons retenu trois combinaisons qui paraissent les plus intéressantes :

N° 1 : incubation de 24 heures à 15° puis de 48 heures à 30° : diamètre des zones : 19 mm.

N° 2 : incubation de 24 heures à 22° puis de 48 heures à 30° : diamètre des zones : 24 mm.

N° 3 : incubation de 24 heures à 22° puis de 24 heures à 37° : diamètre des zones : 14 mm.

N° 4 : incubation de 24 heures à 22°, puis de 24 heures à 30° et enfin de 24 heures à 37° : diamètre des zones : 23 mm.

5. — Etude de la proportion de colonies de streptocoques susceptibles de cultiver après repiquage.

Les essais décrits au paragraphe précédent avaient permis de faire, incidemment, l'observation suivante : si l'on repique en lait tournesolé les colonies de streptocoques qui se sont développées en milieu gélosé, la proportion de celles qui cultivent est faible lorsque les boîtes de Petri contenant le milieu gélosé ont subi une incubation finale à 37°.

Or, la méthode proposée perdrait une partie de son intérêt si elle permettait seulement d'observer les colonies inhibitrices sans permettre leur culture ultérieure.

Nous avons donc effectué une série d'essais dans le but d'établir l'influence de la dose d'inoculation du lactobacille sur la vitalité des colonies de streptocoques ainsi que l'influence des températures initiale et finale d'incubation. Nous avons pu déterminer de cette façon les conditions optima, dans lesquelles on peut à la fois observer les zones d'inhibition et obtenir des cultures viables à partir des colonies produisant ces zones.

Le matériel utilisé pour l'ensemencement des milieux gélosés était constitué, soit par des cultures pures de streptocoques inhibiteurs, soit par des échantillons de lait cru de diverses provenances (Jura, Charente-Maritime, Cantal, etc.). Les résultats de divers essais, portant sur 42 échantillons de lait cru, sont donnés dans le tableau II. On voit que la proportion de colonies viables est effectivement plus élevée pour les milieux incubés à 30° que pour ceux incubés à 37°.

La dose d'inoculation du lactobacille influe de plusieurs manières : en faisant varier cette dose de 5 p. 100 à 0,01 p. 100 nous avons observé que, dans le cas d'une incubation finale à 37°, des doses comprises entre 1 et 0,1 p. 100 suffisent pour obtenir des zones d'inhibition nettes. Mais le pourcentage des colonies de streptocoques donnant des cultures viables est faible, quelles que soient la dose de lactobacille ajoutée et les conditions de température et durée de l'incubation initiale.

D'autre part l'action léthale de l'incubation à 37° est plus marquée pour les colonies donnant des zones d'inhibition de petit diamètre (moins de 10 mm), parmi lesquelles les producteurs de nisine sont d'ailleurs peu

Tableau II

Nombre et proportion des colonies de streptocoques lactiques inhibiteurs susceptibles de cultiver après repiquage.

Colonies inhibitrices classées suivant le diamètre des zones d'inhibition en mm	Nombre de colonies inhibitrices			Pourcentages		
	Repiquées	Ayant cultivé				
	a	Total b	Productrices de nisine* c	$\frac{b}{a}$	$\frac{c}{a}$	$\frac{b}{c}$
	Inoculum LY3 : 0,5 p. 100.			Incubation { initiale : 22°. finale : 37°.		
< 5	93	20	0	2,1	—	—
5 à 10	18	4	1	22,2	5,5	2,5
10 à 15	21	9	3	42,8	14,2	33,3
15 à 20	11	4	4	36,3	36,3	100
> 20	40	38	37	95	92,5	97,3
Ensemble des colonies inhibitrices.........	183	75	45	41	24,5	60
Ensemble des colonies donnant des zones d'un diamètre supérieur à 10 mm.............	72	51	44	71	61	86
	Inoculum LY3 : 1 p. 100.			Incubation { initiale : 22°. finale : 30°		
< 5	64	38	0	59,3	—	—
5 à 10	34	21	1	61,7	2,9	4,7
10 à 15	9	7	6	77,7	66,6	85,7
15 à 20	24	20	17	83,3	70,8	85
> 20	33	32	32	97	97	100
Ensemble des colonies inhibitrices..........	164	118	56	71,9	34,1	47,4
Ensemble des colonies donnant des zones d'un diamètre supérieur à 10 mm.............	66	59	55	89	83	93

(*) On a classé dans cette colonne les streptocoques lactiques qui produisent au moins 50 Unités Reading de nisine en culture sur lait.

nombreux, que pour les colonies donnant des zones d'inhibition plus grandes.

Avec une incubation finale à 30°, la proportion des colonies viables est maxima. A cette température, il faut une dose d'inoculation du lactobacille inférieure ou égale à 1 p. 100 pour obtenir des zones d'inhibition nettes. Avec des doses supérieures à 1 p. 100, le diamètre des zones diminue au fur et à mesure que la dose d'inoculation augmente.

La température de 30° pour l'incubation finale paraît donc être celle à ne pas dépasser pour obtenir à la fois des zones d'inhibition nettes et des colonies de streptocoques donnant après repiquage des cultures viables.

6. — Zones d'inhibition et zones de stimulation du lactobacille.

Les zones d'inhibition développées autour des colonies de streptocoques peuvent, dans certaines conditions, présenter des aspects différents : tantôt la zone d'inhibition totale, qui entoure la colonie de streptocoques, est bordée d'une « couronne » correspondant à une zone de demi-inhibition dans laquelle le lactobacille s'est légèrement développé, tantôt la zone d'inhibition totale est bordée, au contraire, par une zone étroite où la croissance du lactobacille est plus forte et plus dense que dans le reste de la culture.

Nous avons vérifié que les températures et durées d'incubation initiale et finale peuvent être responsables de ces modifications d'aspect.

D'autre part, lorsqu'on ensemence des échantillons de lait ou de fromage, on observe que certaines colonies de streptocoques sont entourées, non d'une zone d'inhibition, mais d'une zone où la croissance du lactobacille est beaucoup plus abondante que celle observée dans le reste de la gélose : ces colonies « stimulantes » se voient particulièrement bien lorsque la dose d'inoculation du lactobacille est relativement faible (0,1 p. 100 par exemple).

7. — Technique proposée pour l'isolement des streptocoques inhibiteurs.

L'ensemble des données réunies au cours de ces essais préliminaires nous permettent maintenant de définir la technique proposée pour l'isolement des streptocoques inhibiteurs.

Le milieu de culture utilisé est celui de Briggs (18) dont nous rappelons la formule :

Jus de tomate	10 p. 100
Neopeptone (Difco)	1,5 p. 100
Glucose	2,0 p. 100
Chlorure de sodium	0,5 p. 100
Tween 80	0,1 p. 100
Yeastrel	0,6 p. 100
Amidon soluble	0,05 p. 100
Eau distillée	q. s. p. 100

La réaction du milieu est ajustée de manière à obtenir un pH final de 7,0.

Ce milieu liquide est utilisé pour l'entretien de l'organisme test : *Lactobacillus lactis* (LY3). Le lactobacille doit être repiqué et cultivé dans des conditions bien définies pour que le nombre des cellules microbiennes inoculées dans le milieu gélosé en boîtes de Petri soit toujours le même. Nous avons adopté la formule suivante : la culture est repiquée à raison d'une goutte pour un tube de 10 ml de bouillon de Briggs et elle est incubée pendant 15 heures à 37°.

Pour rechercher, dénombrer et isoler les streptocoques inhibiteurs, le même milieu de Briggs est gélosé à 2 p. 100 et réparti en tubes conte-

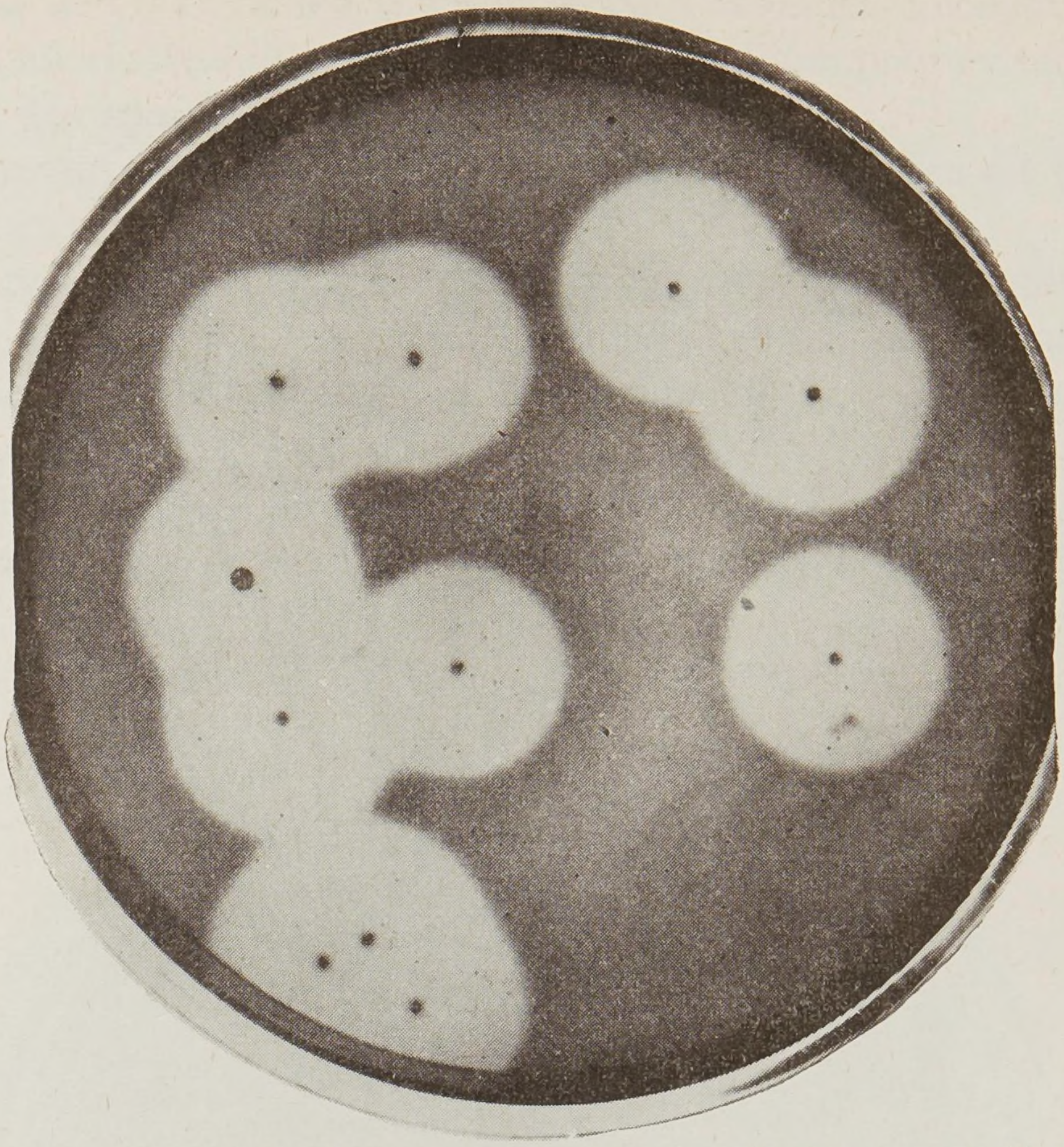


FIG. 1. — Zones d'inhibition données par une culture pure d'un streptocoque (*Str. lactis*) producteur de nisine.



FIG. 2. — Lait de producteur dont la flore dominante est presqu'entièrement composée de streptocoques producteurs de nisine.

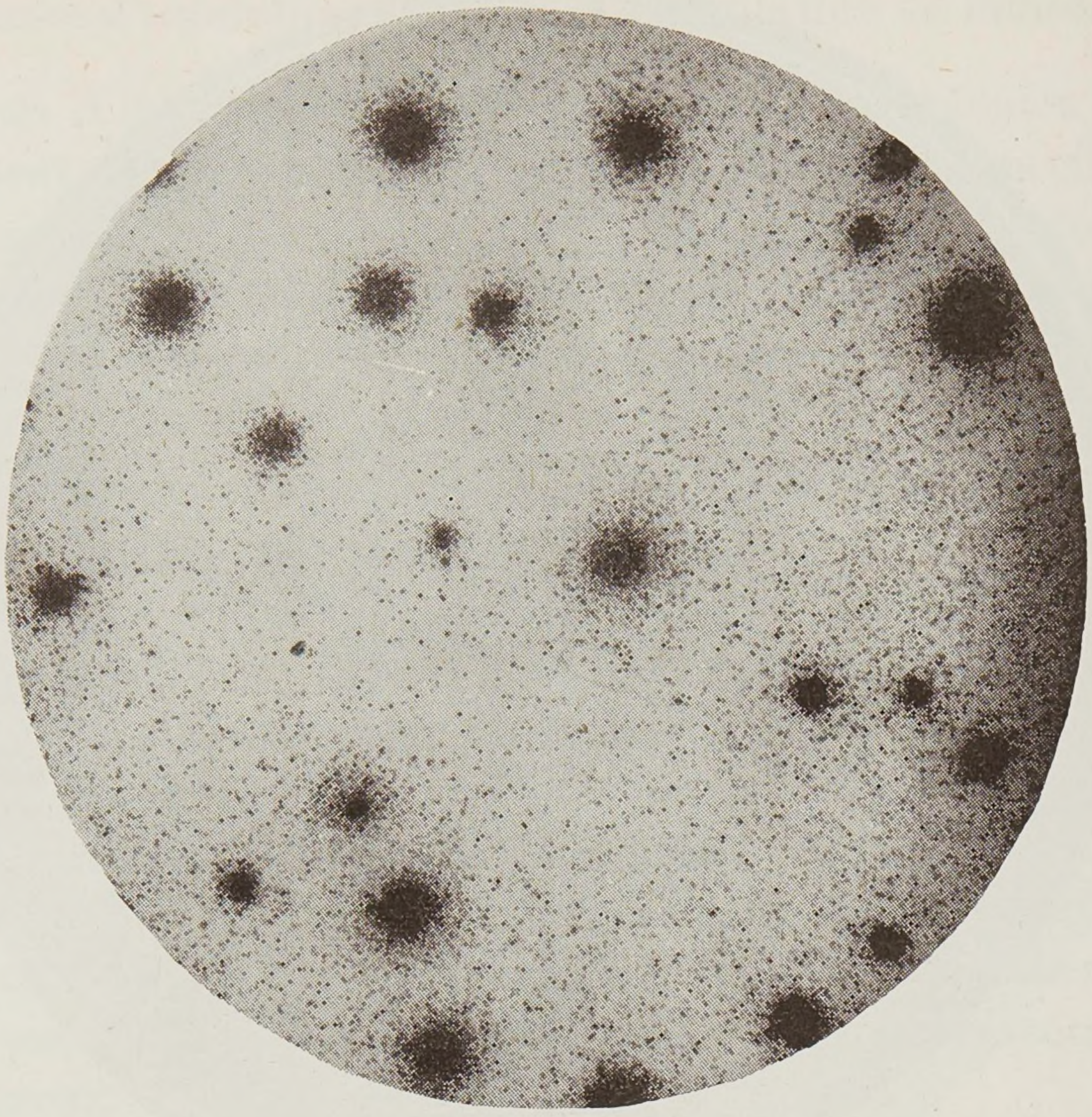


FIG. 3. — Lait de producteur dont la flore dominante est uniquement composée de germes stimulants.

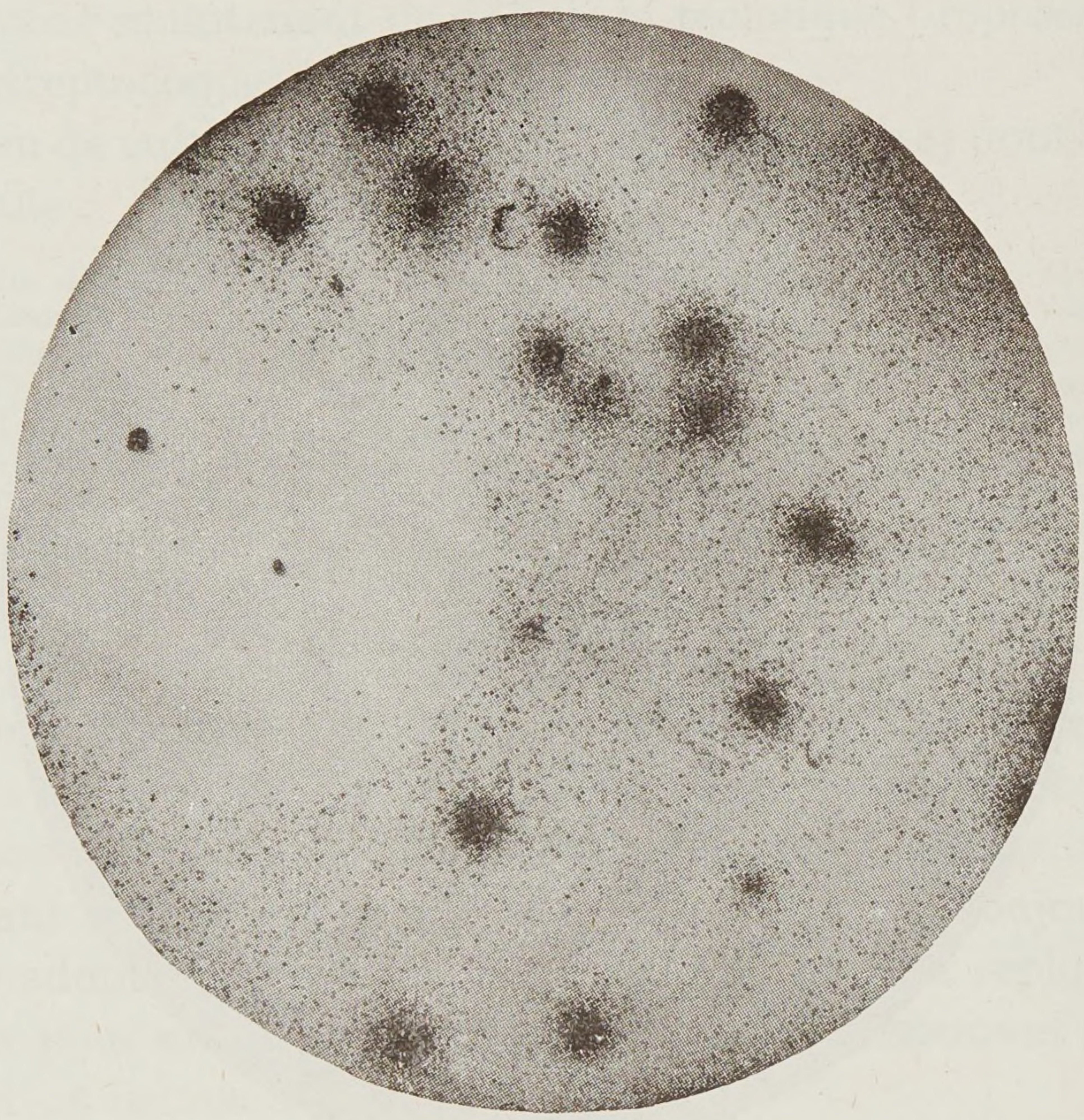


FIG. 4. — Lait de producteur dont la flore dominante est composée à la fois de germes stimulants et de germes producteurs de nisine.

nant chacun 20 ml de milieu. S'il doit servir à l'examen d'échantillons de lait cru, on lui ajoute 0,05 p. 100 d'acétate de thallium pour éviter le développement des sporulés et des bactéries coliformes.

Juste avant de procéder aux ensemencements le milieu est fondu au bain-marie et refroidi à 48°.

Dans une série de boîtes de Petri on place 2 ml d'une dilution au 1/10 dans du Ringer d'une culture de l'organisme test préparée dans les conditions qui viennent d'être indiquées. L'échantillon à examiner est ensuite ensemencé par dilutions successives.

On coule enfin le milieu gélosé dans les boîtes de Petri et on mélange soigneusement.



FIG. 5. — Fromage de Pont l'Evêque fermier dont la flore est composée, pour moitié environ, de streptocoques producteurs de nisine.

Les boîtes de Petri sont incubées pendant 24 heures à 22° puis portées pendant 40 à 48 heures à 30°. On procède alors aux observations et aux repiquages.

La figure 1 montre les résultats obtenus avec une culture pure d'un streptocoque producteur de nisine, les figures 2-3-4 et 5 montrent les résultats obtenus avec divers échantillons de lait cru et de fromage.

Observations sur la technique proposée,

On pourrait simplifier encore la technique en répartissant le milieu gélosé de BRIGGS dans des fioles, à raison de 100 ml par fiole. Ceci permettrait, après inoculation de la gélose fondue avec l'organisme test, de couler toute une série de boîtes.

Nous préférons distribuer le milieu (20 ml) dans des tubes pour les raisons suivantes : *a*) on évite la présence de bulles d'air gênantes dans la gélose, car le tween 80 incorporé au milieu de BRIGGS provoque la formation d'une mousse persistante au moment où l'on mélange dans les fioles la suspension de l'organisme test avec le milieu ; *b*) on coule dans les boîtes des quantités uniformes de milieu, point important lorsqu'il s'agit de procéder à des comparaisons.

En ce qui concerne maintenant le choix des températures et des durées d'incubation, d'autres combinaisons que celles indiquées plus haut peuvent assurément être utilisées, ainsi que nous l'avons indiqué à propos de notre expérience portant sur 75 combinaisons différentes.

S'il s'agit uniquement de déceler les streptocoques inhibiteurs, on peut réduire dans une grande mesure les durées d'incubation et terminer par exemple à 37°, ou encore augmenter la dose d'ensemencement de l'organisme test.

Par contre lorsqu'on veut procéder ensuite à des isolements, il paraît préférable de terminer l'incubation à 30° plutôt qu'à 37°.

Il se peut enfin que l'utilisation comme organisme test d'une souche de lactobacille différente de celle que nous avons retenue puisse nécessiter quelques adaptations de la technique pour tenir compte des exigences particulières à chaque souche.

IV. — APPLICATIONS DE LA MÉTHODE A L'ÉTUDE D'ÉCHANTILLONS DE LAIT CRU ET DE FROMAGES

1. — Origine des échantillons.

a) Laits.

127 échantillons de lait cru (77 provenant du Jura, 50 de la Charente-Maritime) ont été examinés à l'aide de notre technique. Quinze d'entre eux ont été prélevés sur des laits de mélange (lait de « chaudière » servant à la fabrication du Gruyère dans le Jura et lait de mélange prélevé dans le bac de réception des laiteries en Charente-Maritime). Les autres échantillons étaient prélevés dans les bidons de lait apportés par les producteurs.

b) **Fromages.**

50 échantillons de fromages fermiers ont également été examinés : le fromage était préalablement broyé au mortier avec de l'eau stérile et les dilutions étaient faites à partir de l'émulsion ainsi obtenue.

Les fromages examinés appartenaient aux types suivants :

Cantal et Laguiole (8 échantillons) ; Saint-Nectaire (3 échantillons) ; Camembert et Brie (3 échantillons) ; Pont l'Evêque (10 échantillons) ; Fromages d'Epoisses (6 échantillons) ; Livarot (11 échantillons) ; Munster et Maroilles (2 échantillons) ; Fromages de chèvre provenant de la Charente-Maritime (7 échantillons). Ces fromages prélevés à la ferme ou sur les marchés locaux, étaient âgés de quelques jours à quelques semaines au moment de leur analyse.

Dans aucune de ces régions, les streptocoques producteurs de nisine n'ont été utilisés comme levain pour la fabrication du beurre ou du fromage et l'on peut considérer que le peuplement microbien du lait et des fromages fermiers examinés était constitué par les espèces naturellement présentes dans le milieu extérieur.

2. — Résultats.

Le tableau III donne l'essentiel des résultats obtenus au cours de l'examen des échantillons de lait cru et de fromages. Il montre que l'on trouve des germes inhibiteurs dans la moitié environ des échantillons examinés. Cette proportion est encore plus élevée dans les échantillons de lait de mélange.

La proportion des germes inhibiteurs dans la flore totale est très variable d'un échantillon à l'autre. Alors que dans certains on ne trouve aucun germe inhibiteur, d'autres contiennent une proportion relativement faible de ces germes (0,2 p. 100 ou 0,5 p. 100 par exemple). D'autres enfin ont une flore constituée en majorité par des germes inhibiteurs. C'est ainsi que, dans l'un des échantillons de lait, la flore dominante était constituée par des streptocoques producteurs de nisine [1], tandis que la moitié environ de la flore lactique d'un fromage (Pont l'Evêque) était constituée par ces mêmes streptocoques (fig. 2 et 5).

Nous avons calculé la proportion moyenne des germes inhibiteurs dans la flore lactique totale de l'ensemble des échantillons examinés et nous avons trouvé qu'elle était d'environ 7 p. 100 dans le cas du lait et 5 p. 100 dans le cas des fromages. Si l'on calcule cette même proportion non plus pour l'ensemble des échantillons, mais seulement pour ceux qui ont présenté au moins une zone d'inhibition, les chiffres trouvés sont 16 p. 100 environ pour le lait et 9 p. 100 les fromages.

[1] Les germes classés dans cette catégorie sont ceux qui produisent au moins 50 Unités Reading/ml d'une culture sur lait.

Tableau III

Fréquence, et proportion dans la flore totale, des streptocoques lactiques inhibiteurs rencontrés dans les échantillons de lait cru et de fromages fermiers.

Nature des échantillons examinés	Nombre d'échantillons examinés	Pourcentage d'échantillons montrant la présence : de zones d'inhibition	Pourcentage d'échantillons montrant la présence : de streptocoques producteurs de nisine*	Moyenne du nombre total de germes par ml de lait ou par g de fromage	Nombre de germes inhibiteurs p. 100 du nombre total de germes : dans tous les échantillons examinés	Nombre de germes inhibiteurs p. 100 du nombre total de germes : dans tous les échantillons montrant des zones d'inhibition	Nombre de germes producteurs de nisine* p. 100 du nombre total de germes : dans tous les échantillons examinés	Nombre de germes producteurs de nisine* p. 100 du nombre total de germes : dans tous les échantillons montrant des zones d'inhibition
Laits								
Laits de producteurs	112	41	17		6,8	16,8		
Laits de mélange	15	87	73		10,6	12,2		
Total	127	46	25	10^5 — 10^6 val. extrêmes 10^2 — 10^9	7,3 val. extrêmes 0,0 — 100,0	15,8		
Fromages								
Fromages de lait de vache	43	63	25	10^7 — 10^8	5,5	8,8	2,5	3,9
Fromages de lait de chèvre	7	28	0	10^7 — 10^8	2,6	9,3	0,0	0,0
Total	50	58	22	10^7 — 10^8	5,1 val. extrêmes 0,0 — 50,0	8,9	2,1 val. extrêmes 0,0 — 50,0	3,4

(*) Les souches isolées des échantillons dont le pourcentage est indiqué dans cette colonne donnent au moins 50 U. R./ml de nisine en culture sur lait.

Enfin la proportion moyenne des producteurs de nisine, dans la flore lactique totale des fromages est de 2 p. 100, c'est-à-dire que 40 p. 100 environ des inhibiteurs produisent de la nisine en quantité appréciable. Bien que le même chiffre, concernant les producteurs de nisine, n'ait pas pu être calculé pour l'ensemble des échantillons de lait examinés on peut voir, en reprenant les résultats du tableau II, que les colonies productrices de nisine représentent environ 47 p. 100 du nombre total d'inhibiteurs isolés de 42 échantillons de lait. Ce chiffre est donc voisin de celui trouvé pour les fromages.

Les chiffres obtenus au cours de cette étude sont supérieurs à ceux indiqués par KOOY et PETTE (9) en Hollande, mais inférieurs à ceux donnés par HOYLE et NICHOLS (6) en Angleterre. Ils sont assez proches de ceux signalés par COX et WHITEHEAD (5) en Nouvelle-Zélande.

Ils montrent que les streptocoques inhibiteurs, en particulier ceux qui produisent de la nisine, constituent une fraction appréciable de la flore microbienne des laits produits en France ; il est probable que ces streptocoques inhibiteurs exercent une sélection parmi les souches sensibles à la nisine de la flore du lait.

Enfin une proportion notable d'échantillons montre la présence en mélange ou non avec les streptocoques producteurs de nisine, de colonies inhibitrices non productrices de nisine et de colonies « stimulantes » qui conservent en culture pure leur caractère inhibiteur ou stimulant quand on les ré-isole sur milieu gélosé après une série de repiquages sur lait. L'étude biochimique et écologique de ces germes est en cours.

RÉSUMÉ

Une méthode destinée à la numération et à l'isolement des streptocoques inhibiteurs (ou stimulants) présents dans le lait et les produits laitiers (fromages) est décrite dans ce travail. Elle consiste à ensemencer en même temps dans un milieu nutritif gélosé réparti en boîtes de Petri une dilution convenable de l'échantillon à examiner et une suspension de l'organisme test. Ce dernier est un lactobacille (*L. lactis*) se développant seulement à une température égale ou supérieure à 30°.

Les boîtes de Pétri sont incubées d'abord pendant un certain temps (24 heures par exemple) à température relativement basse (15° ou 22°) pour permettre la croissance des colonies de streptocoques et la diffusion dans la gélose des substances inhibitrices (ou stimulantes) que certaines d'entre elles peuvent produire.

Ensuite les boîtes de Pétri sont portées à une température plus élevée (30° ou 37°) de façon à provoquer le développement du lactobacille dans la masse du milieu gélosé. Ce développement se traduit par une opacification uniforme du milieu, sauf autour de certaines colonies de strepto-

coques qui restent entourées d'une zone claire (zone d'inhibition) ou d'une zone où la croissance du lactobacille est au contraire plus forte (zone de stimulation).

Un certain nombre d'échantillons de lait et de fromages, provenant de différentes régions de France, ont été examinés par cette méthode. 20 à 25 p. 100 des échantillons renfermaient des streptocoques producteurs de nisine. La proportion des streptocoques producteurs de nisine par rapport au nombre total de streptocoques lactiques présents dans tous les échantillons examinés est d'environ 2 p. 100. En outre beaucoup d'échantillons donnent naissance à des colonies de streptocoques lactiques qui stimulent la croissance des lactobacilles.

Remerciements.

Nous remercions MM. Etave et Dané de l'Ecole nationale d'Industrie laitière de Surgères, MM. Charet et Lidove de l'Ecole nationale d'Industrie laitière d'Aurillac et M. Blanc Patin de la Station de Recherches laitières de Poligny qui nous ont fait parvenir les échantillons de lait cru examinés dans ce travail. Nous remercions également M. Delacroix à Lisieux et M. Houdoux à Paris qui nous ont procuré les échantillons de fromage.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Rogers (L. A.). — The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bact.*, **16**, 321 à 325, 1928.

(2) Whitehead (H. R.). — A substance inhibiting bacterial growth produced by certain strains of lactic streptococci., *Biochem. J.*, **27**, 1793 à 1800, 1933.

(3) Whitehead (H. R.) et Riddet (W). — Slow development of acidity in cheese manufacture. *N. Z. J. Agr.*, **46**, 225 à 229, 1933.

(4) Meanwell (L. J.). — The influence of raw milk quality on « slowness » in cheesemaking. *Proc. Soc. Agr. Bact.* (Abstr.), 19 à 21, 1943.

(5) Cox (G. A.) et Whitehead (H. R.). — Streptococci which produce a substance inhibiting the growth of lactic streptococci. *N. Z. J. Agr.*, **52**, 38 à 43, 1936.

(6) Hoyle (M.) et Nichols (A. A.). — Inhibitory strains of lactic streptococci and their significance in the selection of culture for starter. *J. Dairy Res.*, **15**, 398 à 408, 1948.

(7) Hirsch (A.) et Wheater (D. M.). — The production of antibiotics by streptococci. *J. Dairy Res.*, **18**, 193 à 197, 1951.

(8) Baribo (L. E.) et Foster (E. M.). — The production of a growth inhibitor by lactic streptococci. *J. Dairy Sci.*, **34**, 1136 à 1144, 1951.

(9) Kooy (J. S.) et Pette (J. W.). — Remming van de groei van Lactaatvergistende Boterzuurbacterien door antibiotica van melkzuurstreptococcen. *Neth. Milk and Dairy J.*, **6**, 302 à 316, 1952.

(10) Mattick (A. T. R.) et Hirsch (A.). — A powerful inhibitory substance produced by group N streptococci. *Nature*, Lond., **154**, 551, 1944.

(11) MATTICK (A. T. R.). — Current research in dairy microbiology in Great Britain. 12^e Congrès Inter. de Laiterie, Stockholm 7, 203 à 217, 1949.

(12) HIRSCH (A.), GRINSTED (E.), CHAPMAN (H. R.). et MATTICK (A. T. R.). — A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in Swiss-type cheese by a nisin-producing streptococcus. *J. Dairy Res.*, **18**, 205 à 206, 1951.

(13) MCCLINTOCK (M.), SERRES (L.), MARZOLF (J. J.), HIRSCH (A.) et MOCQUOT (G.). — Action inhibitrice des streptocoques producteurs de nisine sur le développement des sporulés anaérobies dans le fromage de Gruyère fondu. *J. Dairy Res.*, **19**, 187 à 193, 1952.

(14) KOOY (J. S.) et PETTE (J. W.). — Het toepassen van antibiotica afscheidende melkzuurstreptococcen als zuursel bij het tegengaan van boterzuurgisting in kaas. *Neth. Milk and Dairy J.*, **6**, 317 à 322, 1952.

(15) COX (G. A.). — A simple method for detecting « non acid » milk. *N. Z. J. Agr.*, **49**, 231 à 234, 1934.

(16) KELNER (A.). — A method for investigating large microbial populations for antibiotic activity. *J. Bact.*, **56**, 157 à 162, 1948.

(17) HIRSCH (A.), MCCLINTOCK (M.) et MOCQUOT (G.). — Observations on the influence of inhibitory substances produced by the lactobacilli of Gruyère cheese on the development of anaerobic spore-formers. *J. Dairy Res.*, **19**, 179 à 186, 1952.

(18) BRIGGS (M.). — The classification of Lactobacilli by means of physiological tests. *J. gen. Microbiology*, **9**, 234 à 248, 1953.

ÉTUDE ET CLASSIFICATION DES LEVURES DE VIN DE LA GIRONDE

PAR

Mlle Simone DOMERCQ

(*suite*)

CHAPITRE IV

LEVURES DES RÉGIONS DE VINS ROUGES

I. — RÉGION DU MÉDOC

Dans la région bien délimitée du Médoc, dont les vins forment un ensemble homogène, nous avons prélevé 25 moûts au cours des vendanges des années 1951 et 1952 ; ces moûts provenaient de 22 propriétés classées d'après la hiérarchie commerciale, des premiers crus aux cinquièmes crus, et des crus bourgeois aux vins de Palus (terrains d'alluvions de la Gironde).

Nous avons ainsi obtenu 473 souches de microorganismes, soit en moyenne une vingtaine par vignoble, mais parmi ces souches, 35 appartenant vraisemblablement à l'espèce *Candida mycoderma* se sont montrées incapables de faire fermenter le moût de raisin. Nous n'indiquerons que la répartition des levures qui ont une activité fermentative, soit 438 souches.

Ces travaux sur les levures du Médoc ont fait l'objet en 1953 d'une publication de prise de date (79) et nous ne reviendrons pas sur le détail des résultats obtenus. Nous donnons dans le tableau I la répartition des espèces de levures isolées par cru ; le tableau récapitulatif II a été légèrement modifié, car le classement de quelques souches a été reconsidéré. Il précise la répartition entre les 5 genres, trois genres non sporogènes et deux genres sporogènes, et les 14 espèces, des 438 levures fermentatives isolées.

Afin d'avoir une idée du rôle joué par chaque espèce dans la fermentation, nous avons calculé sa fréquence parmi les souches isolées et le nombre et le pourcentage des moûts contenant ces espèces. Ces chiffres n'ont évidemment qu'une valeur relative mais restent significatifs. Ainsi, nous avons obtenu 254 souches de *K. apiculata* sur 438 souches isolées, soit 58 p. 100 de la totalité et 135 souches de *Sacch. ellipsoïdeus* soit 30,8 p. 100. Cela ne prouve pas, bien entendu, que la fermentation des vins du Médoc soit conduite surtout par *K. apiculata* ; en réalité, nous nous sommes placés dans les conditions où l'on rencontre surtout ces

levures. En effet, d'une part notre échantillonnage a été effectué sur les raisins et d'autre part, nous avons prélevé un plus grand nombre de colonies au début de la fermentation qu'à la fin ; le nombre de *Saccharomyces ellipsoïdeus* prenant part à la fermentation a donc été, de ce fait, limité.

La fréquence de chaque espèce dans les 25 moûts donne une indication sur son importance géographique. Ainsi, nous avons trouvé *K. apiculata* dans tous les moûts étudiés et *Sacch. ellipsoïdeus* dans 24 sur 25. Ces deux espèces étant les plus communes, les plus répandues, jouent certainement le rôle le plus important. Par comparaison, *Sacch. oviformis* que nous avons trouvé dans 12 p. 100 des moûts et *Sacch. steineri* dans 8 p. 100 des moûts, paraissent n'être que des levures secondaires. Toutefois, il ne faut pas négliger leur action, ni supposer totalement absentes les levures que nous n'avons pas observées, le nombre des colonies prélevées étant faible.

TABLEAU I

Répartition par cru des espèces de levures isolées (Médoc).

N° du cru	Classification et origine	Année	Nombre de souches	Genres et espèces	Degré moyen	Acidité volatile moyenne
1	1er cru, Pauillac	1951	24	13 *K. apiculata.*	4°6	0,88
				8 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°2	1,05
				2 *Sacch. carlsbergensis.*	8°9	0,86
				1 *Sacch. chevalieri.*	12°9	1,09
		1952	18	2 *K. apiculata.*	4°6	0,97
				16 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°3	1,07
2	2e cru, Pauillac	1951	20	15 *K. apiculata.*	5°1	1,03
				4 *Sacch. ellipsoïdeus.*	11°6	1,22
				1 *Sacch. oviformis.*	12°7	1,38
3	2e cru, Saint-Julien ...	1951	19	14 *K. apiculata.*	3°8	0,92
				5 *Sacch. florentinus.*	8°2	0,60
4	2e cru, Saint-Julien ...	1952	17	11. *K. apiculata.*	4°3	0,97
				3 *Sacch. chevalieri.*	12°1	1,40
				1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	11°6	1,28
				2 *P. fermentans.*	7°0	0,62
5	2e cru, Margaux	1951	15	10 *K. apiculata.*	5°0	0,98
				5 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°1	1,27
6	2e cru, Cantenac	1952	23	11 *K. apiculata.*	4°9	1,15
				7 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°5	1,19
				5 *Sacch. fructuum.*	12°7	1,09
7	3e cru, Cantenac	1951	17	12 *K. apiculata.*	5°0	0,75
				5 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°2	1,08
		1952	17	5 *K. apiculata.*	4°6	1,30
				6 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°2	1,10
				6 *T. bacillaris.*	7°7	0,68
8	3e cru, Saint-Estèphe ..	1951	18	13 *K. apiculata.*	4°8	1,73
				5 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°7	1,25
9	3e cru, Labarde	1952	18	12 *K. apiculata.*	4°5	1,33
				6 *Sacch. ellipsoïdeus.*	11°3	1,00
10	4e cru, Saint-Julien ...	1951	19	14 *K. apiculata.*	4°0	1,68
				3 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°8	1,38
				2 *Sacch. chevalieri.*	13°1	1,15
		1952	21	9 *K. apiculata.*	5°0	1,20
				12 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°2	1,00
11	5e cru, Pauillac	1951	13	7 *K. apiculata.*	4°2	1,27
				1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	11°7	1,00
				5 *T. famata.*	2°3	0,06

TABLEAU I *(suite)*

Nº du cru	Classification et origine	Année	Nombre de souches	Genres et espèces	Degré moyen	Acidité volatile moyenne
12	5e cru, Pauillac	1951	14	1 *K. apiculata.*	4°2	0,87
				12 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°2	0,98
				1 *Sacch. steineri.*	13°4	0,88
13	5e cru, Pauillac	1951	17	12 *K. apiculata.*	3°3	0,91
				4 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°7	1,18
				1 *Sacch. steineri.*	14°0	1,32
14	5e cru, Macau	1951	15	10 *K. apiculata.*	4°3	0,97
				3 *Sacch. ellipsoïdeus.*	11°7	1,05
				2 *Sacch. bayanus.*	12°6	1,26
15	Cru bourgeois supérieur, Saint-Estèphe	1951	18	9 *K. apiculata.*	4°9	0,80
				4 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°3	1,37
				1 *Sacch. oviformis.*	13°4	1,46
				4 *Rh. mucilaginosa.*	—	—
16	Cru bourgeois supérieur, Cussac.............	1951	18	13 *K. apiculata.*	3°7	1,20
				5 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°7	1,31
17	Cru bourgeois supérieur, Soussans	1951	16	11 *K. apiculata.*	3°7	1,39
				5 *Sacch. ellipsoïdeus.*	11°2	1,34
18	Cru bourgeois supérieur, Moulis	1951	16	11 *K. apiculata.*	4°3	2,06
				1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°9	1,08
				4 *Sacch. uvarum.*	7°8	0,80
19	Cru bourgeois, Cissac ..	1951	19	14 *K. apiculata.*	3°8	0,96
				4 *Sacch. ellipsoïdeus.*	11°6	1,36
				1 *Sacch. oviformis.*	12°5	1,54
20	Cru bourgeois, Cissac ..	1951	17	12 *K. apiculata.*	3°9	1,11
				2 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°9	1,14
				1 *Sacch. chevalieri.*	13°2	1,40
				1 *Sacch. bayanus.*	12°8	1,50
				1 *Sacch. uvarum.*	9°3	0,86
21	Cru bourgeois, Cussac .	1951	14	3 *K. apiculata.*	—	—
				11 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°2	1,09
22	Palus, Labarde	1951	15	10 *K. apiculata.*	4°0	1,16
				5 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°9	1,23

TABLEAU II

Tableau récapitulatif des espèces de levures des vins du Médoc.
438 souches isolées de 25 moûts.

	Nombre de souches	Fréquence p. 1000 souches	Nombre de moûts	Fréquence p. 100 moûts
Kloeckera apiculata	254	579,8	25	100
Torulopsis bacillaris	6	13,7	1	4
Torulopsis famata	5	11,5	1	4
Rhodotorula mucilaginosa	4	9,1	1	4
Saccharomyces ellipsoïdeus	135	308,0	24	96
Saccharomyces oviformis	3	6,8	3	12
Saccharomyces bayanus	3	6,8	2	8
Saccharomyces chevalieri	7	16,0	4	16
Saccharomyces fructuum	5	11,5	1	4
Saccharomyces carlsbergensis	2	4,6	1	4
Saccharomyces uvarum	5	11,5	2	8
Saccharomyces florentinus	5	11,5	1	4
Saccharomyces steineri	2	4,6	2	8
Pichia fermentans	2	4,6	1	4

TABLEAU III

Répartition des levures du Médoc d'après leur pouvoir alcoogène.

	1°-2°	2°-3°	3°-4°	4°-5°	5°-6°	6°-7°	7°-8°	8°-9°	9°-10°	10°-11°	11°-12°	12°-13°	13°-14°	14°-15°	15°-16°	16°-17°	Totaux
Kloeckera apiculata		3	74	114	58												249
Torulopsis bacillaris							5	1									6
Torulopsis famata	1	4															5
Sacch. ellipsoïdeus								2	5	15	35	32	32	7	4	2	134
Sacch. oviformis												3					3
Sacch. bayanus													3				3
Sacch. chevalieri										1	2	2	2				7
Sacch. fructuum										1	1	3					5
Sacch. carlsbergensis										1			1				2
Sacch. uvarum							2	2	1								5
Sacch. florentinus									2	3							5
Sacch. steineri													1	1			2
Pichia fermentans					1	1											2
Totaux	1	7	74	114	59	1	7	5	8	21	38	40	39	8	4	2	428

Nous avons trouvé dans certains moûts 3, 4, et même pour l'un d'eux, 5 espèces de levures différentes. Qualitativement la microflore est donc excessivement variée, d'autant plus que, comme il a été dit, nous n'en avons ici qu'une image incomplète. Tous les vins sans exception résultent de fermentations associées. 10 moûts sur 25 donnent l'exemple de l'association classique *K. apiculata* — *Sacch. ellipsoïdeus*. Mais dans d'autres les levures d'appoint apparaissent presque aussi nombreuses, et exceptionnellement même, plus nombreuses, que *Sacch. ellipsoïdeus*.

Le pouvoir alcoogène des levures du Médoc est compris entre 1° et 17°. Ce sont bien entendu, les levures sporogènes qui sont capables de donner le plus d'alcool. *K apiculata* forme, suivant les souches, de 2° à 6° et *Sacch. ellipsoïdeus* de 8° à 17°, mais le plus grand nombre des souches de cette dernière espèce se place entre 10° et 14°.

Les degrés atteints par les autres *Saccharomyces* (*chevalieri*, *fructuum*, *bayanus*, *steineri*) se placent également entre 11° et 14°, à part *Sacch. uvarum* dont le pouvoir alcoogène est nettement plus faible et se situe entre 7° et 10°. En général, les levures du Médoc présentent, par rapport à celles d'autres régions de la Gironde, des pouvoirs alcoogènes moins élevés. Cela peut expliquer les difficultés de vinification qu'on rencontre en Médoc les années où les raisins sont très riches en sucre.

Les acidités volatiles formées par ces levures, reproduites dans le tableau I, sont beaucoup plus élevées que celles qui sont habituellement observées dans la pratique de la vinification. Il en sera toujours de même au cours de ce travail. Cette différence est due à la grande richesse en sucre du moût d'expérience, et aussi au fait que la production d'acidité volatile est plus élevée dans les moûts pasteurisés et surtout autoclavés. Ces chiffres d'acidité volatile doivent être considérés pour leur valeur comparative et non pour leur intérêt œnologique.

En comparant les levures d'une même espèce issues des divers crus du Médoc, nous avons observé de grandes différences, notamment dans le pouvoir alcoogène, la production d'acidité volatile et l'aspect des colonies géantes. Les variations de ces trois caractères ne sont pas conjuguées, mais nous pensons qu'elles mettent en évidence l'existence de races différentes à l'intérieur de chaque espèce : ainsi, en observant les colonies géantes de 105 souches de *Sacch. ellipsoïdeus*, nous avons reconnu 66 types différents ; 10 sont communs à des *Sacch. ellipsoïdeus* prélevés en divers endroits du Médoc, mais 56 correspondent à 56 souches différentes isolées chacune dans un seul cru. Nous ne donnerons pas ici le détail de nos observations sur la présence de races différentes d'une même espèce, dans un même cru et d'un cru à un autre, car elles ont déjà fait l'objet d'une publication (79).

II. — RÉGIONS DU LIBOURNAIS, DES GRAVES ET DES PREMIÈRES CÔTES

Nous étudierons dans cette partie les levures prélevées en 1952 et 1953 dans les régions de vins rouges du Libournais (appellations Saint-Emilion, Pomerol, Puisseguin-Saint-Emilion, Montagne-Saint-Emilion), des Premières Côtes de Bordeaux sur la rive droite de la Garonne, et des Graves sur la rive gauche. Nous avons échantillonné 28 moûts dans la première région, trois dans la seconde et deux dans la troisième. Nous avons obtenu ainsi 650 microorganismes, comprenant 632 souches fermentatives qui nous ont été fournies par 33 moûts au total, à raison d'une vingtaine de souches par moût, comme dans le Médoc.

Les tableaux IV, V et VI indiquent la répartition par cru des levures

TABLEAU IV

Répartition par cru des espèces de levures isolées
(Appellation Saint-Emilion).

N° du cru	Origine	Année	Nombre de souches	Genres et espèces	Degré moyen	Acidité volatile moyenne
1	Château A, Saint-Émilion	1952	18	6 *K. apiculata.*	4°7	1,09
				10 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°5	1,53
				1 *Sacch. oviformis.*	14°4	1,71
				1 *Sacch. chevalieri.*	12°0	1,65
2	Château B, Saint-Émilion	1952	24	7 *K. apiculata.*	4°8	1,37
				4 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°0	1,59
				13 *Sacch. chevalieri.*	12°9	1,70
3	Château C, Saint-Émilion	1953	24	5 *K. apiculata.*	—	—
				13 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°8	1,39
				3 *Sacch. oviformis.*	15°9	1,01
				2 *Sacch. chevalieri.*	14°6	1,10
				1 *Brettanomyces vini.*	13°1	0,86
4	Château C. B., Saint-Émilion	1952	11	8 *K. apiculata.*	4°7	1,32
				3 *Sacch. ellipsoïdeus.*	10°9	1,41
5	Château C. F., Saint-Émilion	1952	24	9 *K. apiculata.*	4°8	1,17
				14 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°7	1,59
				1 *Sacch. fructuum.*	10°8	1,41
6	Château Cr, Saint-Émilion	1953	18	5 *K. apiculata.*	—	—
				11 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°2	1,41
				1 *Sacch. chevalieri.*	11°9	1,53
				1 *Sacch. steineri.*	14°2	1,35
7	Château F, Saint-Emilion	1952	15	8 *K. apiculata.*	5°4	1,06
				6 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°1	1,65
				1 *P. membranaefaciens.*	2°3	0,30
8	Château G. P., Saint-Émilion	1952	24	6 *K. apiculata.*	4°9	1,01
				16 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°8	1,53
				1 *P. membranaefaciens.*	3°0	0,86
				1 *Candida pulcherrima.*	—	—

TABLEAU IV *(suite)*

N° du cru	Origine	Année	Nombre de souches	Genres et espèces	Degré moyen	Acidité volatile moyenne
9	Château G. N., Saint-Émilion	1952	16	2 *K. apiculata.*	4°7	1,10
				10 *Sacch. ellipsoïdeus.*	15°0	1,35
				1 *Sacch. chevalieri.*	17°1	1,65
				3 *T. rosei.*	6°8	0,16
10	Château L, Saint-Émilion	1952	24	9 *K. apiculata.*	4°2	1,16
				15 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°5	1,53
11	Château M, Saint-Sulpice-de-Faleyrens	1952	23	1 *K. apiculata.*	4°3	1,01
				16 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°1	1,41
				1 *T. rosei.*	6°0	0,12
				5 *Candida pulcherrima.*	1°8	0,09
12	Château P. D., Saint-Émilion	1952	16	4 *K. apiculata.*	4°4	1,12
				12 *Sacch. ellipsoïdeus.*	10°8	1,35
13	Château Pe, Saint-Émilion	1952	24	6 *K. apiculata.*	5°2	1,03
				15 *Sacch. ellipsoïdeus.*	11°1	1,53
				3 *Sacch. chevalieri.*	11°7	1,35
14	Château R, Saint-Émilion	1953	22	4 *K. apiculata.*	—	—
				15 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°8	1,56
				1 *Sacch. chevalieri.*	12°6	1,77
				2 *Debaryomyces hansenii.*	—	—
15	Château S, Saint-Émilion	1952	24	10 *K. apiculata.*	4°8	1,12
				12 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°2	1,53
				2 *Sacch. chevalieri.*	12°7	1,28
16	Château V. G., Saint-Étienne-de-Lisse.....	1952	24	2 *K. apiculata.*	4°3	0,93
				13 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°3	1,41
				3 *Sacch. oviformis.*	13°7	1,59
				3 *Sacch. chevalieri.*	12°9	1,44
				3 *T. rosei.*	7°0	0,32

isolées dans les trois régions énumérées. Nous avons groupé les crus par appellation : 16 pour « Saint-Emilion », 12 pour « Pomerol », « Puisseguin Saint-Emilion » et « Montagne-Saint-Emilion », 5 pour « Graves » et « Premières Côtes ». Le nombre d'espèces isolées dans chaque cru est assez variable : il peut aller de un à sept mais dans les conditions où nous avons opéré, nous avons rencontré le plus souvent de deux à quatre espèces dans chaque moût.

Nous avons isolé 18 espèces de levures différentes dont le tableau VII donne la liste. Les 632 souches fermentatives appartiennent à quatre genres non sporogènes et cinq genres sporogènes. Cette plus grande variété par rapport à celle observée dans la région du Médoc, provient sans doute en partie de la méthode de prélèvement employée. Ici encore la récolte des échantillons a été faite surtout sous forme de raisins, mais les souches ont été isolées pendant le cours de la fermentation et non pas seulement dans le moût initial et dans le liquide obtenu après fermentation.

Tableau V

Répartition par cru des espèces de levures isolées
(Appellations Pomerol, Puisseguin-Saint-Emilion et Montagne Saint-Emilion).

Nº du cru	Origine	Année	Nombre de souches	Genres et espèces	Degré moyen	Acidité volatile moyenne
17	Château S. G., Montagne	1952	6	6 *Sacch. ellipsoïdeus.*	10°4	1,77
18	Château C, Pomerol ...	1953	24	4 *K. apiculata.*	—	—
				16 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°6	1,52
				2 *Sacch. chevalieri.*	11°5	1,68
				1 *T. bacillaris.*	11°9	0,49
				1 *P. fermentans.*	13°0	0
19	Château E, Pomerol ...	1952	12	10 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°5	1,54
				2 *Sacch. oviformis.*	11°7	1,83
20	Château En, Pomerol..	1952	20	9 *K. apiculata*	5°1	0,94
				5 *Sacch. ellipsoïdeus.*	11°0	1,50
				6 *H. anomala.*	5°2	0,60
21	Château M, Pomerol ..	1952	4	1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°7	1,53
				3 *Sacch. chevalieri.*	14°8	1,77
22	Château N, Pomerol...	1952	12	8 *K. apiculata.*	5°4	0,77
				2 *Sacch. ellipsoïdeus.*	10°0	1,59
				2 *T. rosei.*	6°3	0,15
23	Château P. V., Pomerol	1952	24	6 *K. apiculata.*	4°4	1,19
				17 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°1	1,83
				1 *Sacch. chevalieri.*	13°6	1,53
24	Château P, Pomerol ...	1952	12	6 *K. apiculata.*	4°2	1,35
				6 *Sacch. ellipsoïdeus.*	9°8	1,47
25	Château B. A., Puisseguin	1953	20	4 *K. apiculata.*	—	—
				14 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°9	1,41
				2 *Debaryomyces hansenii.*		
26	Domaine D. L., Puisseguin	1953	35	3 *K. apiculata.*	—	—
				18 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°9	1,41
				1 *Sacch. oviformis.*	11°9	0,03
				11 *T. rosei.*	11°8	1,32
				1 *H. anomala.*	4°1	0,61
				1 *K. jensenii.*	—	—
27	C. C., Puisseguin	1953	20	2 *K. apiculata.*	—	—
				18 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°7	1,48
28	Château G. L., Puisseguin	1953	21	3 *K. apiculata.*	—	—
				15 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°4	1,48
				1 *Sacch. oviformis.*	13°5	1,16
				1 *Sacch. chevalieri.*	15°6	1,28
				1 *T. rosei.*	11°7	0,03

D'après les chiffres du tableau VII, l'espèce prépondérante est *Sacch. ellipsoïdeus* qui groupe 58 p. 100 des souches prélevées, tandis que *K. apiculata* vient en second rang avec 25 p. 100 de la population totale. Cette proportion est à peu près l'inverse de celle que nous avions observée dans la région du Médoc ; mais il faut considérer que nous avons volontairement limité le nombre de souches prélevées au début de la fermentation, et par conséquent, de *K. apiculata*. En effet, en considérant la fréquence de ces deux espèces dans les moûts, nous constatons qu'elles sont associées dans 30 cas sur 33. Lorsque *K. apiculata* fait parfois défaut,

TABLEAU VI

Répartition par cru des espèces de levures isolées
(Appellations Graves, Premières Côtes).

N° du cru	Origine	Année	Nombre de souches	Genres et espèces	Degré moyen	Acidité volatile moyenne
29	Château H, Pessac	1953	17	4 *K. apiculata.*	—	—
				7 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°1	1,35
				1 *Sacch. chevalieri.*	14°2	1,28
				1 *Sacch. uvarum.*	15°7	0,61
				1 *Sacch. carlsbergensis.*	13°0	1,62
				2 *Sacch. steineri.*	14°8	1,44
				1 *T. bacillaris.*	11°3	0,61
30	Château P, Pessac	1953	14	2 *K. apiculata.*	—	—
				8 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°1	1,63
				3 *T. bacillaris.*	11°1	0,48
				1 *Debaryomyces hansenii.*	—	—
31	Cambes, Premières Côtes	1953	15	3 *K. apiculata.*	—	—
				11 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°4	1,32
				1 *K. africana.*	10°3	0,40
32	Camblanes, Premières Côtes	1953	21	3 *K. apiculata.*	—	—
				16 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°7	1,45
				1 *Sacch. oviformis.*	14°0	1,22
				1 *T. bacillaris.*	10°7	0,61
33	Quinsac, Premières Côtes	1953	24	6 *K. apiculata.*	—	—
				11 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°4	1,32
				3 *Sacch. oviformis.*	15°7	0,69
				1 *T. rosei.*	13°0	0,06
				3 *Brettanomyces vini.*	12°7	3,51

alors que *Sacch. ellipsoïdeus* est présent dans tous les moûts, c'est que l'échantillon prélevé était déjà en pleine fermentation.

Sacch. chevalieri domine un groupe de levures assez courantes qu'il constitue avec *Sacch. oviformis* et *Torulaspora rosei.* Cette importance est en accord avec la fréquence géographique de ces espèces que l'on trouve dans 20 à 40 p. 100 des moûts. Un troisième groupe renferme les espèces qui n'apparaissent que dans un petit nombre de moûts. Parmi celles-ci, nous rangeons une souche de *K. africana* et une souche de *K. jensenii,* ainsi que quatre souches de *Brettanomyces* qui proviennent, l'une de Saint-Emilion, les autres de Quinsac : la présence de cette dernière espèce n'est donc pas simplement un cas unique. Nous avons exposé dans le chapitre III les raisons pour lesquelles nous avons donné à ces souches le nom de *Brettanomyces vini.* Il est nécessaire de souligner que la présence de *Brettanomyces* dans les vins a été assez rarement observée (1, 4, 44, 83, 98). Nous avons aussi trouvé *Hansenula anomala, Pichia fermentans* et *Pichia membranaefaciens.*

Dans le tableau VIII nous avons classé 576 souches d'après leur pouvoir alcoogène qui s'échelonne de 1° à 19°, lorsque ces levures sont essayées sur un moût suffisamment riche en sucre.

Comme dans la région du Médoc, *K. apiculata* forme de 3 à 6° d'alcool,

tandis que la souche de *K. africana* a un pouvoir alcoogène beaucoup plus élevé et atteint 10°.

Les levures qui forment le moins d'alcool sont *Candida pulcherrima*, *Pichia membranaefaciens*, puis *Hansenula anomala*. Ces dernières espèces forment des voiles superficiels et produisent beaucoup d'esters. La formation d'alcool par *Torulaspora rosei* varie entre 6° et 13°.

Le groupe des *Saccharomyces* est naturellement le plus alcoogène : il produit de 8° à 19°. 98,5 p. 100 des *Sacch. ellipsoïdeus* forment de 10° à 17° ; les autres *Saccharomyces* se placent de même dans cette zone.

D'une façon générale, les levures des régions du Libournais, des Graves et des Premières Côtes sont assez fortement alcoogènes puisque 75 p. 100 de celles que nous avons isolées forment plus de 10°.

Il existe de notables différences entre les espèces prélevées au début et à la fin de la fermentation : les deux prélèvements effectués sur les échantillons du Médoc nous l'avaient montré, en 1951. Aussi les années suivantes, avons-nous effectué plusieurs prélèvements sur le moût conservé à la température du laboratoire : au bout d'un jour, au bout de quatre ou de huit jours, au bout d'un mois et de deux mois ; parfois il nous a été possible de prélever parallèlement du moût fermentant en cuve dans les conditions de la pratique. Bien que chaque moût n'ait pu toujours être suivi régulièrement et que les divers prélèvements varient d'importance, l'ensemble des résultats permet de tirer des conclusions intéressantes. Pour rendre la lecture du tableau IX plus facile, nous avons

Tableau VII

Tableau récapitulatif des espèces de levures des vins rouges du Libournais, des Graves et des Premières Côtes.

632 souches isolées de 33 moûts.

	Nombre de souches	Fréquence p. 1000 souches	Nombre de moûts	Fréquence p. 100 moûts
Kloeckera apiculata	155	245,1	30	91
Kloeckera africana	1	1,6	1	3
Kloeckera jensenii	1	1,6	1	3
Torulopsis bacillaris	6	9,5	4	12
Brettanomyces vini	4	6,3	2	6
Candida pulcherrima	6	9,5	2	6
Saccharomyces ellipsoïdeus	366	579,1	33	100
Saccharomyces oviformis	15	23,7	8	24
Saccharomyces chevalieri	35	55,4	14	42
Saccharomyces fructuum	1	1,6	1	3
Saccharomyces carlsbergensis	1	1,6	1	3
Saccharomyces uvarum	1	1,6	1	3
Saccharomyces steineri	3	4,8	2	6
Torulaspora rosei	22	34,8	7	21
Hansenula anomala	7	11,1	2	6
Pichia fermentans	1	1,6	1	3
Pichia membranaefaciens	2	3,2	2	6
Debaryomyces hansenii	5	7,9	3	9

TABLEAU VIII

Répartition des levures du Libournais, des Graves et des Premières Côtes rouges d'après leur pouvoir alcoogène

	1° — 2°	2° — 3°	3° — 4°	4° — 5°	5° — 6°	6° — 7°	7° — 8°	8° — 9°	9° — 10°	10° — 11°	11° — 12°	12° — 13°	13° — 14°	14° — 15°	15° — 16°	16° — 17°	17° — 18°	18° — 19°	Totaux
K. apiculata			8	62	37														107
K. africana										1									1
T. bacillaris										2	4								6
Brett. vini											1		3						4
C. pulcherrima	3	3																	6
Sacch. ellipsoïdeus								2	7	33	50	54	71	69	59	16	4	1	366
Sacch. oviformis											3		1	5	3	1			13
Sacch. chevalieri											10	9	6	6	2	1	1		35
Sacch. fructuum													1						1
Sacch. carlsbergensis													1						1
Sacch. uvarum															1				1
Sacch. steineri													1	2					3
Torulaspora rosei						6	3	1		2	4	6							22
Hansenula anomala				4	2	1													7
P. fermentans													1						1
P. membranaefaciens		1	1																2
Totaux	3	4	9	66	39	7	3	3	7	38	72	69	85	82	65	18	5	1	576

Tableau IX

Succession des espèces de levures au cours de la fermentation.
Régions de vins rouges.

Les chiffres indiquent le pourcentage de fréquence pour chaque prélèvement.

	Avant fermentation 461 souches	Demi-fermentation 177 souches	Fin de la fermentation 233 souches
Kloeckera apiculata	78,7	19,2	0
Kloeckera africana	0	0,6	0
Kloeckera jensenii	0,2	0	0
Torulopsis bacillaris	1,3	3,4	0
Torulopsis famata	1,1	0	0
Brettanomyces vini	0	2,2	0
Candida pulcherrima	1,3	0	0
Rhodotorula mucilaginosa	1,0	0	0
Total des levures non sporogènes	*83,6*	*25,4*	*0*
Saccharomyces ellipsoïdeus	13,0	62,2	73,8
Saccharomyces oviformis	0,2	0,6	6,0
Saccharomyces chevalieri	0,4	6,2	7,7
Saccharomyces bayanus	0	0	1,3
Saccharomyces fructuum	0	0	1,3
Saccharomyces carlsbergensis	0,4	0	0,4
Saccharomyces uvarum	0	0	2,6
Saccharomyces florentinus	0	0	2,1
Saccharomyces steineri	0,2	1,1	0,9
Torulaspora rosei	2,2	0	0,4
Hansenula anomala	0	2,3	1,3
Pichia fermentans	0	0	1,3
Pichia membranaefaciens	0	0,6	0
Debaryomyces hansenii	0	1,7	0,9
Total des levures sporogènes	*16,4*	*74,7*	*100*

groupé les prélèvements effectués dans toutes les régions de vins rouges, en distinguant seulement trois périodes : avant le départ de la fermentation : 461 souches ; à la demi-fermentation : 177 souches ; et à la fin de la fermentation : 233 souches.

On remarque que 79 p. 100 des souches isolées avant la fermentation sont des *K. apiculata*, la proportion diminue par la suite et après avoir été de 19 p. 100 seulement au milieu de la fermentation, on n'en trouve plus au bout d'un mois. *Sacch. ellipsoïdeus* suit l'évolution inverse : de 13 p. 100 du prélèvement effectué avant fermentation, la proportion passe à 62 p. 100 au milieu et à 74 p. 100 à la fin de la fermentation. Les autres espèces sont plus rares, mais on peut noter quelques caractères remarquables : *Sacch. oviformis, Sacch. bayanus, Sacch. fructuum, Sacch, uvarum, Sacch. florentinus, P. fermentans* sont surtout des levures de fin de fermentation ; *Sacch. chevalieri*, et *Sacch. steineri* apparaissent plus tôt, ainsi que *H. anomala*, tandis que *K. jensenii, T. famata, C. pulcherrima* et *Rh. mucilaginosa* ont été trouvées uniquement dans les premiers jours. *T. bacillaris* a une action plus prolongée et persiste plus longtemps dans le moût, quant à *K. africana* et *Br. vini*, ces deux espèces ont été trouvées pendant la pleine fermentation.

D'une façon générale, les espèces non sporogènes sont nombreuses au début de la fermentation, alors que les espèces sporogènes présentent leur maximum d'activité vers la fin de ce phénomène.

En résumé, nous avons isolé sur les moûts prélevés un nombre assez élevé d'espèces de levures : on peut dire que la microflore des régions de vins rouges est extrêmement variée. Mais il y a apparemment peu de différences entre les divers crus : on observe partout l'association *K. apiculata-Sacch. ellipsoïdeus* qui est la base de la microflore du moût ; quelques espèces sont assez courantes enfin d'autres n'apparaissent que dans un petit nombre de cas. Le pouvoir alcoogène des levures apporte une nouvelle échelle de classification. On observe qu'il est généralement plus élevé dans les régions du Libournais, des Graves et Premières Côtes que dans le Médoc. La succession des espèces au cours de la fermentation apporte la confirmation de l'importance des espèces sporogènes. En fait ce sont elles qui font le vin, car leur action est la plus prolongée et ce sont aussi les plus alcoogènes.

Chapitre V

LEVURES DES RÉGIONS DE VINS BLANCS

La région bordelaise produit des vins blancs qu'on peut classer en deux types différents, bien que cette distinction par région de production n'ait rien d'absolu. Les uns sont secs ou peu sucrés ; ils proviennent de raisins non pourris ou peu pourris. Ils correspondent plus particulièrement, pour les régions que nous avons étudiées, aux appellations « Graves », « Entre-deux-Mers », « Graves de Vayres », « Bordeaux-Sainte-Foy » et « Côtes de Montravel », cette dernière en Dordogne. Les autres vins blancs sont liquoreux et sont vinifiés à partir de raisins attaqués par *Botrytis cinerea*, dans des conditions dites « pourriture noble ». Ces vins proviennent soit de la rive gauche de la Garonne (« Barsac » et « Sauternes »), soit des côteaux de la rive droite (« Premières Côtes », « Sainte-Croix-du-Mont ») et dans la Dordogne, de « Monbazillac ».

Nous avons étudié séparément les levures des régions de ces deux sortes d'appellations et nous les avons désignées par les termes : régions de raisins blancs non pourris et régions de pourriture noble.

I. — RÉGIONS DE RAISINS BLANCS NON POURRIS

Aux vendanges de 1953, nous avons prélevé 15 moûts de raisins blancs, desquels nous avons isolé 380 souches de levures fermentatives, soit environ 24 souches par moût.

La répartition de ces souches entre les divers crus est donnée dans le tableau X. Dans chaque moût, nous avons rencontré de trois à sept espèces de levures, le plus souvent cinq. Les levures de raisins blancs nous paraissent donc un peu plus variées que celles des raisins rouges. Cette observation s'explique en partie par le nombre plus élevé de souches étudiées.

Dans une Cave coopérative, nous avons prélevé deux moûts différents, l'un de densité inférieure à 13° Baumé, l'autre de densité supérieure ; ils présentent en gros les mêmes espèces de levures.

Les 380 souches fermentatives se répartissent entre deux genres non

TABLEAU X

Répartition par cru des espèces de levures isolées.
Régions de vins blancs non pourris.

Nº du cru	Origine	Année	Nombre de souches	Genres et espèces	Degré moyen	Acidité volatile moyenne
1	Léognan, Graves	1953	17	2 *K. apiculata.*	—	—
				9 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°8	1,51
				6 *Sacch. oviformis.*	17°9	1,20
2	Villenave d'Ornon, Graves	1953	18	1 *K. apiculata.*	—	—
				12 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°0	1,33
				1 *Sacch. oviformis.*	18°1	1,28
				4 *T. rosei.*	13°0	0
3	Martillac, Graves	1953	30	2 *K. apiculata.*	—	—
				22 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°6	1,44
				2 *Sacch. oviformis.*	18°2	0,84
				4 *T. bacillaris.*	11°0	0,52
4	Castres, Graves	1953	28	21 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°8	1,24
				1 *Sacch. oviformis.*	13°4	1,71
				1 *Sacch. chevalieri.*	13°3	1,10
				5 *T. bacillaris.*	10°8	0,58
5	Portets, Graves	1953	27	2 *K. apiculata.*	—	—
				17 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°1	1,29
				2 *Sacch. oviformis.*	15°8	1,43
				4 *Sacch. steineri.*	15°8	1,62
				2 *Sacch. heterogenicus.*	18°2	0,73
6	Blasimon, Entre-deux-Mers	1953	18	5 *K. apiculata.*	—	—
				10 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°1	1,35
				1 *Sacch. oviformis.*	12°5	1,77
				1 *Saccharomycodes ludwigii.*	13°0	0,37
				1 *T. bacillaris.*	—	—
7	Grézillac, Entre-deux-Mers	1953	24	1 *K. apiculata.*	—	—
				13 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°7	1,22
				3 *Sacch. oviformis.*	15°3	0,42
				3 *Sacch. chevalieri.*	13°9	0,53
				2 *Sacch. carlsbergensis.*	9°5	0,55
				1 *Sacch. uvarum.*	—	—
				1 *Sacch. steineri.*	—	—
8	Créon, Entre-deux-Mers	1953	23	5 *K. apiculata.*	—	—
				14 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°2	1,40
				1 *Sacch. oviformis.*	15°6	0,33
				2 *Sacch. fructuum.*	15°4	0,92
				1 *Sacch. carlsbergensis.*	11°4	0,88

TABLEAU X *(suite)*

N° du cru	Origine	Année	Nombre de souches	Genres et espèces	Degré moyen	Acidité volatile moyenne
9	Rauzan, Entre-deux-Mers	1953	21	5 *K. apiculata.*	—	—
				12 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°3	1,39
				2 *Sacch. oviformis.*	13°7	1,11
				1 *Sacch. chevalieri.*	11°2	0,54
				1 *T. rosei.*	10°7	0
10	Romagne, Entre-deux-Mers	1953	24	18 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°5	1,24
				2 *Sacch. chevalieri.*	13°0	0,30
				2 *Sacch. steineri.*	13°0	1,39
				2 *T. bacillaris.*	11°0	0,30
11	Vayres, Graves de Vayres	1953	19	3 *K. apiculata.*	—	—
				13 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°8	1,13
				3 *Sacch. chevalieri.*	12°8	1,24
12	Montcarret, Dordogne	1953	33	11 *K. apiculata.*	—	—
				12 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°4	1,36
				5 *Sacch. oviformis.*	17°9	0,93
				1 *T. rosei.*	10°6	0,15
				4 *T. bacillaris.*	9°4	0,70
13	Saint-Vivien, Dordogne.	1953	32	9 *K. apiculata.*	—	—
				17 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°2	1,41
				1 *Sacch. oviformis.*	18°2	1,32
				1 *T. rosei.*	8°4	0,46
				4 *T. bacillaris.*	11°7	0,50
14	Port Sainte-Foy, $d > 13°B$	1953	31	4 *K. apiculata.*	—	—
				17 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°3	1,22
				4 *Sacch. oviformis.*	18°3	0,52
				2 *T. rosei.*	11°7	0,12
				4 *T. bacillaris.*	11°1	0,55
15	Port Sainte-Foy, $d < 13°B$	1953	35	7 *K. apiculata.*	—	—
				17 *Sacch. ellipsoïdeus.*	15°0	1,29
				5 *Sacch. oviformis.*	18°2	1,04
				1 *Sacch. chevalieri.*	18°3	1,19
				5 *T. bacillaris.*	10°8	0,43

sporogènes (*Kloeckera* et *Torulopsis*) et trois genres sporogènes (*Saccharomyces, Saccharomycodes* et *Torulaspora*). Nous avons obtenu 13 espèces, dont la liste est donnée dans le tableau XI.

Un fait apparaît en premier lieu : c'est la faible proportion de *K. apiculata* : 150 souches seulement pour 1000, alors que le genre *Saccharomyces* groupe 750 souches sur 1000. En réalité, devant le peu de diversité des *Kloeckera* rencontrées, nous avons limité le nombre des souches prélevées dans les premiers jours de la fermentation. D'ailleurs, la présence de *K. apiculata* dans 13 moûts sur 15, montre bien que cette espèce est aussi répandue que *Sacch. ellipsoïdeus*.

Sacch. ellipsoïdeus est ainsi l'espèce la plus couramment rencontrée : 590 souches sur 1000. Puis vient *Sacch. oviformis* avec 90 p. 1000 ; ce fait est remarquable car dans les régions de vins rouges cette espèce n'avait pas présenté une si grande importance. De même, *Torulopsis bacillaris* dont le rôle était tout à fait secondaire dans les régions de vins rouges, se

place au troisième rang avec 76 p. 1000. Un troisième groupe de levures, toutes sporogènes, comprend *Sacch. chevalieri*, *Sacch. steineri* et *Torulaspora rosei*. Chacune de ces espèces représente 20 à 30 p. 1000 des souches.

Les autres espèces n'ont qu'une importance secondaire. On remarque l'apparition de deux espèces de *Saccharomyces*, non représentées dans les raisins rouges, *Sacch. heterogenicus* et *Sacch. elegans*, et de *Saccharomycodes ludwigii* ; ces levures ont été trouvées chacune dans un seul moût.

TABLEAU XI

Tableau récapitulatif des espèces de levures isolées de raisins non pourris.

(Graves, Entre-deux-Mers, Graves-de-Vayres, Côtes de Montravel, Bordeaux-Sainte-Foy).

380 souches isolées de 15 moûts.

	Nombre de souches	Fréquence p. 1000 souches	Nombre de moûts	Fréquence p. 100 moûts
Kloeckera apiculata	57	150	13	87
Torulopsis bacillaris	29	76,3	8	53
Saccharomyces ellipsoïdeus	224	589,5	15	100
Saccharomyces oviformis	34	89,4	13	87
Saccharomyces chevalieri	11	29,0	6	40
Saccharomyces fructuum	2	5,2	1	7
Saccharomyces carlsbergensis	3	7,9	2	13
Saccharomyces uvarum	1	2,6	1	7
Saccharomyces steineri	7	18,5	3	20
Saccharomyces heterogenicus	2	5,2	1	7
Saccharomyces elegans	1	2,6	1	7
Saccharomycodes ludwigii	1	2,6	1	7
Torulaspora rosei	8	21,1	4	27

Après l'association quasi-générale de *K. apiculata* et *Sacch. ellipsoïdeus*, on constate que *Sacch. oviformis* est aussi répandu que *K. apiculata* et que *T. bacillaris* et *Sacch. chevalieri* sont ensuite les levures les plus courantes.

II. — LES LEVURES DES RÉGIONS DE POURRITURE NOBLE

Nous avons prélevé douze moûts sur la rive droite de la Garonne et onze dans les vignobles de la rive gauche. Ces moûts n'étaient pas tous au même stade de la fermentation ; pour certains même, prélevés à Sainte-Croix-du-Mont et Monbazillac la fermentation était terminée.

Nous avons obtenu 573 souches fermentatives dont la répartition par cru est indiquée dans les tableaux XII (rive droite de la Garonne et Monbazillac) et XIII (rive gauche de la Garonne). Dans chaque cru, nous avons isolé deux à huit espèces. La microflore est donc ici encore très variée.

Tableau XII

Répartition par cru des espèces de levures isolées.
(Régions de pourriture noble : Rive droite de la Garonne et Monbazillac.)

Nº du cru	Origine	Année	Nombre de souches	Genres et espèces	Degré moyen	Acidité volatile moyenne
1	Cadillac, Premières Côtes	1953	24	1 *K. apiculata.*	—	—
				16 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°0	1,54
				2 *Sacch. oviformis.*	18°3	1,22
				1 *Sacch. steineri.*	15°2	1,25
				1 *T. delbrueckii.*	13°7	0,73
				3 *T. bacillaris.*	11°4	0,47
2	Rions, Premières Côtes.	1953	5	4 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°8	1,94
				1 *T. bacillaris.*	10°8	0,30
3	Cadillac, Premières Côtes	1953	29	6 *K. apiculata.*	—	—
				16 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°7	1,34
				2 *Sacch. oviformis.*	18°1	1,32
				1 *Sacch. fructuum.*	13°2	1,47
				1 *Sacch. steineri.*	13°7	1,77
				1 *T. rosei.*	8°4	0
				2 *T. bacillaris.*	12°0	0,46
4	Cadillac, Premières Côtes	1953	22	4 *K. apiculata.*	—	—
				11 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°6	1,32
				1 *Sacch. oviformis.*	13°4	1,35
				1 *Sacch. chevalieri.*	12°6	1,28
				1 *Sacch. steineri.*	12°8	1,28
				4 *T. bacillaris.*	10°4	0,61
5	Omet, Premières Côtes.	1953	29	5 *K. apiculata.*	—	—
				14 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°9	1,34
				1 *Sacch. chevalieri.*	15°6	0,86
				1 *Sacch. florentinus.*	9°0	0,30
				8 *T. bacillaris.*	11°1	0,45
6	Château L, Sainte-Croix-du-Mont (vin)	1953	4	3 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°2	1,93
				1 *Sacch. carlsbergensis.*	13°0	1,71
7	Château L, Sainte-Croix-du-Mont (moût)	1953	24	2 *K. apiculata.*	6°4	0,98
				8 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°6	1,37
				1 *Sacch. oviformis.*	14°0	1,22
				1 *Sacch chevalieri.*	14°0	1,10
				1 *Sacch. veronae.*	8°6	0,18
				1 *T. rosei.*	9°6	0
				1 *P. fermentans.*	10°7	0,37
				9 *T. bacillaris.*	10°9	0,48
8	Vélines, Haut-Montravel	1953	29	5 *K. apiculata.*	—	—
				11 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°4	1,43
				5 *Sacch. oviformis.*	16°8	1,00
				8 *T. bacillaris.*	10°7	0,47
9	Monbazillac nº 1	1953	29	6 *K. apiculata.*	—	—
				13 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°8	1,69
				2 *Sacch. oviformis.*	18°3	1,23
				8 *T. bacillaris.*	9°9	0,73
10	Monbazillac nº 2	1953	29	8 *K. apiculata.*	—	—
				15 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°1	1,61
				2 *Sacch. oviformis.*	18°4	1,19
				2 *Sacch. carlsbergensis.*	12°0	0,67
				2 *T. bacillaris.*	10°4	0,61
11	Monbazillac nº 3	1953	34	12 *K. apiculata.*	—	—
				15 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°3	1,47
				1 *Sacch. carlsbergensis.*	10°9	0,73
				2 *T. rosei.*	10°1	0
				4 *T. bacillaris.*	10°4	0,50
12	Monbazillac nº 4	1953	31	4 *K. apiculata.*	—	—
				16 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°4	1,47
				3 *Sacch. oviformis.*	13°8	1,34
				1 *Sacch. chevalieri.*	13°4	1,65
				1 *Sacch. acidifaciens.*	8°2	0,24
				6 *T. bacillaris.*	10°7	0,49

Tableau XIII

Répartition par cru des espèces de levures isolées.
(Régions de pourriture noble : Rive gauche de la Garonne.)

Nº du cru	Origine	Année	Nombre de souches	Genres et espèces	Degré moyen	Acidité volatile moyenne
13	Cérons, Graves	1953	28	6 *K. apiculata.*	—	—
				14 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°5	1,50
				2 *Sacch. oviformis.*	17°7	1,77
				1 *Sacch. chevalieri.*	14°6	1,35
				5 *T. bacillaris.*	10°4	0,48
14	Saint-Pierre de Mons, Graves	1953	30	6 *K. apiculata.*	—	—
				11 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°3	1,36
				6 *Sacch. oviformis.*	18°3	0,95
				1 *Sacch. carlsbergensis.*	7°3	0,86
				1 *Sacch. steineri.*	14°6	1,59
				1 *Sacch. heterogenicus.*	14°8	0,98
				3 *T. bacillaris.*	10°8	0,52
				1 *C. mycoderma.*	—	—
15	Château Ca, Barsac ...	1953	31	1 *K. apiculata.*	—	—
				22 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°1	1,44
				3 *Sacch. oviformis.*	14°6	1,18
				1 *Sacch. steineri.*	13°8	1,77
				4 *T. bacillaris.*	10°3	0,60
16	Château Co, Barsac ...	1953	21	7 *K. apiculata.*	—	—
				12 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°6	1,42
				2 *Sacch. acidifaciens.*	10°6	0,12
17	Château D-V, Barsac ..	1953	31	7 *K. apiculata.*	—	—
				16 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°7	1,52
				2 *Sacch. chevalieri.*	15°3	1,25
				1 *Sacch. steineri.*	14°5	1,19
				1 *Sacch. heterogenicus.*	14°5	1,22
				4 *T. bacillaris.*	11°1	0,44
18	Château P, Barsac	1953	23	1 *K. apiculata.*	—	—
				13 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°1	1,41
				4 *Sacch. oviformis.*	18°2	1,05
				1 *Sacch. fructuum.*	14°9	1,04
				1 *Sacch. steineri.*	14°6	1,35
				3 *T. bacillaris.*	11°0	0,48
19	Château M, Preignac ..	1953	27	3 *K. apiculata.*	—	—
				14 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°2	1,35
				4 *Sacch. oviformis.*	18°2	1,06
				6 *T. bacillaris.*	10°8	0,48
20	Château H. P., Sauternes	1953	28	3 *K. apiculata.*	—	—
				12 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°3	1,18
				5 *Sacch. oviformis.*	17°8	1,00
				1 *Sacch. chevalieri.*	13°3	1,10
				1 *Sacch. elegans.*	11°0	0,12
				1 *T. rosei.*	9°6	0
				1 *P. membranaefaciens.*	8°6	0,18
				4 *T. bacillaris.*	11°3	0,47
21	Château R. S., Sauternes	1953	25	6 *K. apiculata.*	—	—
				13 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°5	1,45
				1 *Sacch. elegans.*	9°0	0
				5 *T. bacillaris.*	10°9	0,43
22	Château R, Fargues ...	1953	27	2 *K. apiculata.*	—	—
				15 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°7	1,42
				2 *Sacch. acidifaciens.*	8°5	1,07
				8 *T. bacillaris.*	10°2	0,52
23	Château Y, Sauternes .	1953	14	2 *K. apiculata.*	—	—
				9 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°5	1,45
				1 *Sacch. heterogenicus.*	11°0	0,06
				1 *Sacch. elegans.*	13°0	1,10
				1 *T. bacillaris.*	11°4	—

Les 573 souches se répartissent en deux genres non sporogènes (*Kloeckera* et *Torulopsis*) et trois genres sporogènes (*Saccharomyces, Torulaspora* et *Pichia*). Le tableau XIV indique la répartition de ces levures entre les 17 espèces isolées.

La proportion de *K. apiculata* est assez faible parmi les souches isolées bien que cette espèce soit présente dans 21 moûts sur 23. Les deux cas ne présentant pas de *K. apiculata* correspondent à des prélèvements effectués en fin de fermentation.

Le genre *Saccharomyces* est moins prépondérant que dans les régions de vins blancs non pourris, à cause de l'importance prise par *Torulopsis bacillaris*. Cette levure groupe autant de souches que *K. apiculata*. Ce fait est caractéristique des raisins attaqués par la pourriture noble.

TABLEAU XIV

Tableau récapitulatif des espèces de levures isolées de raisins « pourris noble »
573 souches isolées de 23 moûts.

	Nombre de de souches	Fréquence p. 1000 souches	Nombre de moûts	Fréquence p. 100 moûts
Kloeckera apiculata	97	169,2	21	91
Torulopsis bacillaris	98	171,0	21	91
Saccharomyces ellipsoïdeus	293	511,3	23	100
Saccharomyces oviformis	42	73,2	14	61
Saccharomyces chevalieri	8	13,9	7	30
Saccharomyces fructuum	2	3,5	2	9
Saccharomyces carlsbergensis	5	8,7	4	7
Saccharomyces florentinus	1	1,8	1	4
Saccharomyces steineri	7	12,2	6	26
Saccharomyces heterogenicus	3	5,2	3	13
Saccharomyces acidifaciens	5	8,7	3	13
Saccharomyces elegans	3	5,2	3	13
Saccharomyces veronae	1	1,8	1	4
Torulaspora rosei	5	8,7	4	17
Torulaspora delbrueckii	1	1,8	1	4
Pichia fermentans	1	1,8	1	4
Pichia membranaefaciens	1	1,8	1	4

Saccharomyces oviformis avec 73 souches p. 1000 reste une des espèces les plus importantes tandis que *Sacch. chevalieri* et *Sacch. steineri* dominent le groupe des levures secondaires. La fréquence parmi les moûts confirme ces observations. Comme *K. apiculata, T. bacillaris* a été trouvé dans 21 moûts pourris sur 23, tandis que *Sacch. ellipsoïdeus* est présent dans tous. *Sacch. oviformis* est ensuite l'espèce la plus répandue (61 p. 100 des moûts).

Sacch. acidifaciens et *T. rosei* ont été isolés dans les régions de raisins pourris, alors que nous n'en avions pas trouvé sur les raisins blancs sains.

Comme dans les régions de vins rouges, nous avons mesuré le pou-

Tableau XV

Répartition des levures des régions de vins blancs d'après leur pouvoir alcoogène.

	7°-8°	8°-9°	9°-10°	10°-11°	11°-12°	12°-13°	13°-14°	14°-15°	15°-16°	16°-17°	17°-18°	18°-19°	19°-20°	Totaux
Torulopsis bacillaris	1	1	9	50	43	4	1							109
Saccharomyces ellipsoïdeus		1	3	13	39	108	101	132	76	35	4	2	1	515
Sacch. oviformis					1	1	7	9	6	2	4	46		76
Sacch. chevalieri					1	3	8	3	3		1			19
Sacch. fructuum							1	1	1	1				4
Sacch. carlsbergensis	1		2	2	1	1	1							8
Sacch. florentinus			1											1
Sacch. uvarum		1												1
Sacch. steineri			1			3	3	4	1		1			13
Sacch. heterogenicus					1			2		1		1		5
Sacch. acidifaciens		2	1	1	1									5
Sacch. elegans			1		1		1							3
Sacch. veronae		1												1
Saccharomycodes ludwigii							1							1
Torulaspora rosei		2	2	3	3	1	3							14
Torulaspora delbrueckii							1							1
Pichia fermentans				1										1
Pichia membranaefaciens		1												1
Totaux	2	9	20	70	91	121	128	151	87	39	10	49	1	778

voir alcoogène des levures de vins blancs sur un moût suffisamment riche en sucre. Le tableau XV indique la classification des levures d'après ce test, sauf pour *Kloeckera apiculata* dont le pouvoir alcoogène est à peu près constant et toujours très faible.

Les 18 espèces étudiées peuvent former de 7 à 20° d'alcool.

Le pouvoir alcoogène de *Torulopsis bacillaris* s'échelonne entre 7 et 14° ; 90 p. 100 des souches de cette espèce forment 10 à 12°.

Les *Sacch. ellipsoïdeus* ont des pouvoirs alcoogènes très variables, entre 8 et 20° ; mais la majorité d'entre eux (80 p. 100) forme de 12 à 16°.

Les chiffres du tableau mettent en évidence le pouvoir alcoogène particulièrement élevé de *Sacch. oviformis*. Cette levure forme normalement plus de 18° d'alcool ; seules, quelques souches ont un pouvoir alcoogène plus faible, mais il est toujours supérieur à 11°.

Les autres *Saccharomyces* forment des quantités d'alcool assez variables ; ceux qui peuvent en produire le plus sont *Sacch. chevalieri, fructuum, steineri* et *heterogenicus*. Les moins alcoogènes sont *Sacch. carlsbergensis, uvarum, florentinus, acidifaciens, elegans et veronae.*

TABLEAU XVI

Succession des espèces de levures au cours de la fermentation.
Régions de vins blancs.

Les chiffres indiquent les pourcentages de fréquence pour chaque prélèvement.

	Avant fermentation 213 souches	Demi-fermentation 208 souches	Fin de la fermentation 165 souches
Kloeckera apiculata	36,1	0	0
Torulopsis bacillaris	23,4	1,0	0
Total des levures non sporogènes	*59,5*	*1,0*	*0*
Saccharomyces ellipsoïdeus	31,4	87,5	50,3
Saccharomyces oviformis	0,5	2,4	38,1
Saccharomyces chevalieri	0,5	3,8	3,6
Saccharomyces fructuum	0,9	0	0,6
Saccharomyces carlsbergensis	2,3	1,0	0
Saccharomyces uvarum	0,5	0	0
Saccharomyces steineri	2,3	1,9	1,2
Saccharomyces heterogenicus	0	0,5	1,8
Saccharomyces acidifaciens	0,5	0,5	1,2
Saccharomyces elegans	0	0,5	0
Saccharomyces veronae	0	0,5	0
Saccharomycodes ludwigii	0	0	0,6
Torulaspora rosei	0,9	0,5	2,4
Torulaspora delbrueckii	0,5	0	0
Total des levures sporogènes	*40,3*	*99,1*	*99,8*

L'unique souche isolée de *Saccharomycodes ludwigii* a un bon pouvoir alcoogène, 13°. *Torulaspora rosei* s'échelonne entre 8 et 14°.

Le pouvoir alcoogène des levures des régions de vins blancs est donc

en moyenne assez élevé, puisque 78 p. 100 d'entre elles forment plus de 10°.

Afin de vérifier l'importance de chaque espèce dans le déroulement de la fermentation, nous avons étudié la composition des prélèvements de souches effectués à divers moments de la fermentation : avant fermentation (213 souches étudiées) ; après 20 jours de fermentation à la température du laboratoire (208 souches) et après 3 mois, c'est-à-dire à la fin de la fermentation (165 souches).

Le tableau XVI rend compte des résultats obtenus. *K. apiculata* toujours très abondant au début , disparaît rapidement, ainsi que *T. bacillaris*. Par contre, *Sacch. ellipsoïdeus* présente un maximum d'activité au milieu de la fermentation. Le nombre de ses souches décroît ensuite tandis que la quantité de *Sacch. oviformis* ne cesse de croître et atteint 38 p. 100 à la fin de la fermentation. Le même phénomène s'observe avec *Sacch. heterogenicus*, *Sacch. acidifaciens*, et *Torulaspora rosei*. L'unique souche de *Saccharomycodes ludwigii* a été isolée après la fin de la fermentation.

En résumé, il se confirme que les levures non sporogènes sont des levures de début de fermentation (59,5 p. 100 le premier jour), tandis que les levures sporogènes assurent à elles seules la fermentation dès que cette première phase est passée. On observe que *Sacch. ellipsoïdeus* agit principalement au milieu de la fermentation. Son achèvement est assuré par la participation d'autres levures parmi lesquelles *Sacch. oviformis* a un rôle prépondérant.

En conclusion, nous avons observé une grande variété parmi les souches de levures isolées dans les régions de vins blancs : 953 souches appartenant à 19 espèces.

Nous avons trouvé dans presque tous les moûts l'association classique *K. apiculata* — *Sacch. ellipsoïdeus* mais quelques caractères particuliers se sont faits remarquer selon qu'il s'agissait des régions de raisins non pourris ou des régions de pourriture noble : ainsi, *Sacch. oviformis* dans les premières et *Torulopsis bacillaris* dans les secondes prennent l'importance principale après *Sacch. ellipsoïdeus* et *K. apiculata*.

Dans la succession des espèces qui conduisent la fermentation, on observe le rôle éphémère des espèces non sporogènes qui sont très vite remplacées par les espèces sporogènes. Quelques espèces manifestent un maximum d'activité vers la fin de la fermentation, notamment *Sacch. oviformis*.

Le pouvoir alcoogène des levures des régions de vins blancs est assez élevé, mais *Sacch. oviformis* se signale encore par une aptitude exceptionnelle à produire de l'alcool. Cette espèce joue donc en définitive un rôle très important dans les fermentations de vins blancs.

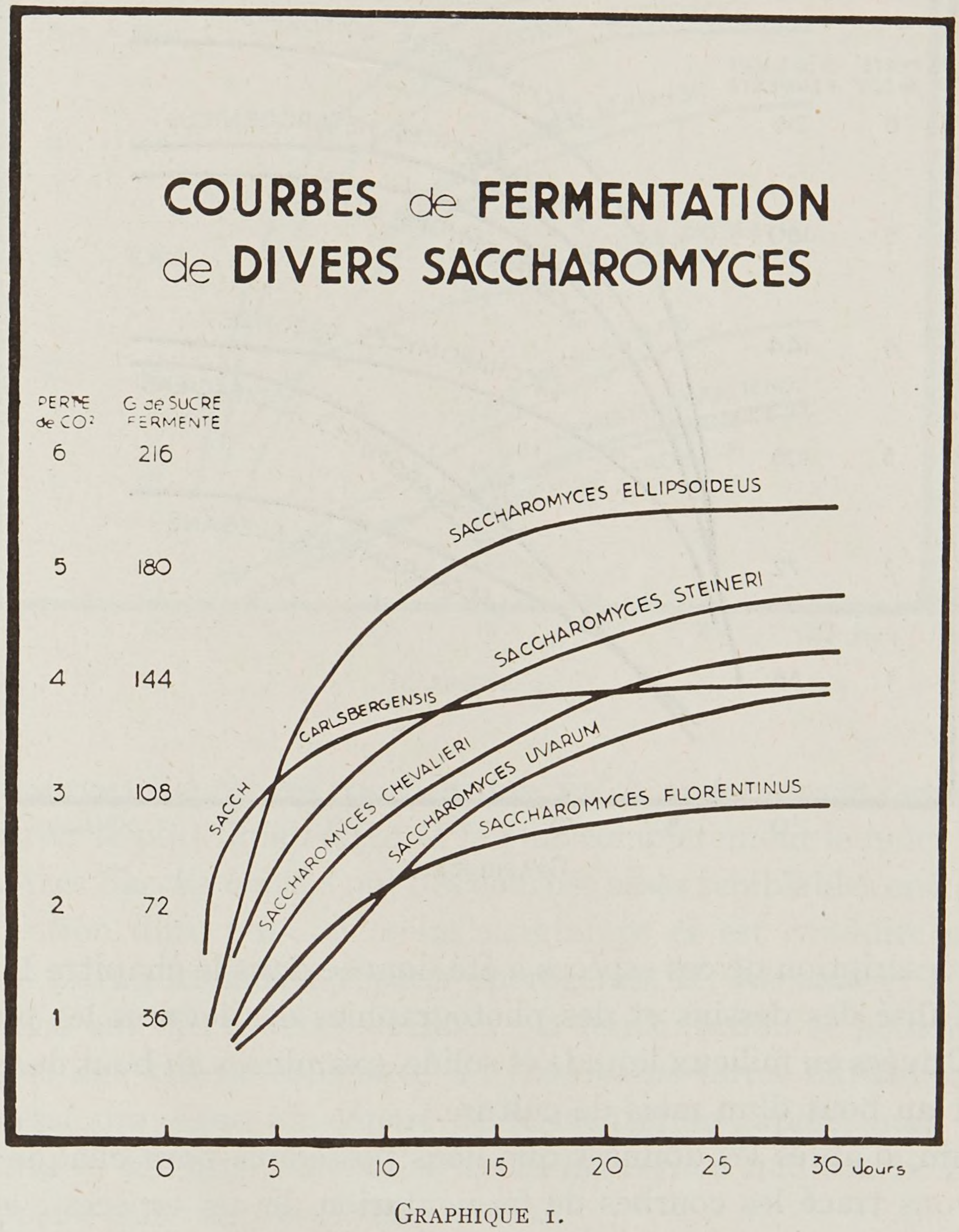
Chapitre VI

RÉCAPITULATION DES LEVURES DE VINIFICATION

Nos recherches nous ont permis d'isoler au total 2 023 souches de levures fermentatives à partir de 96 moûts. Les résultats obtenus, tant dans les régions de vins rouges que dans les régions de vins blancs, sont réunis dans le tableau récapitulatif XVII.

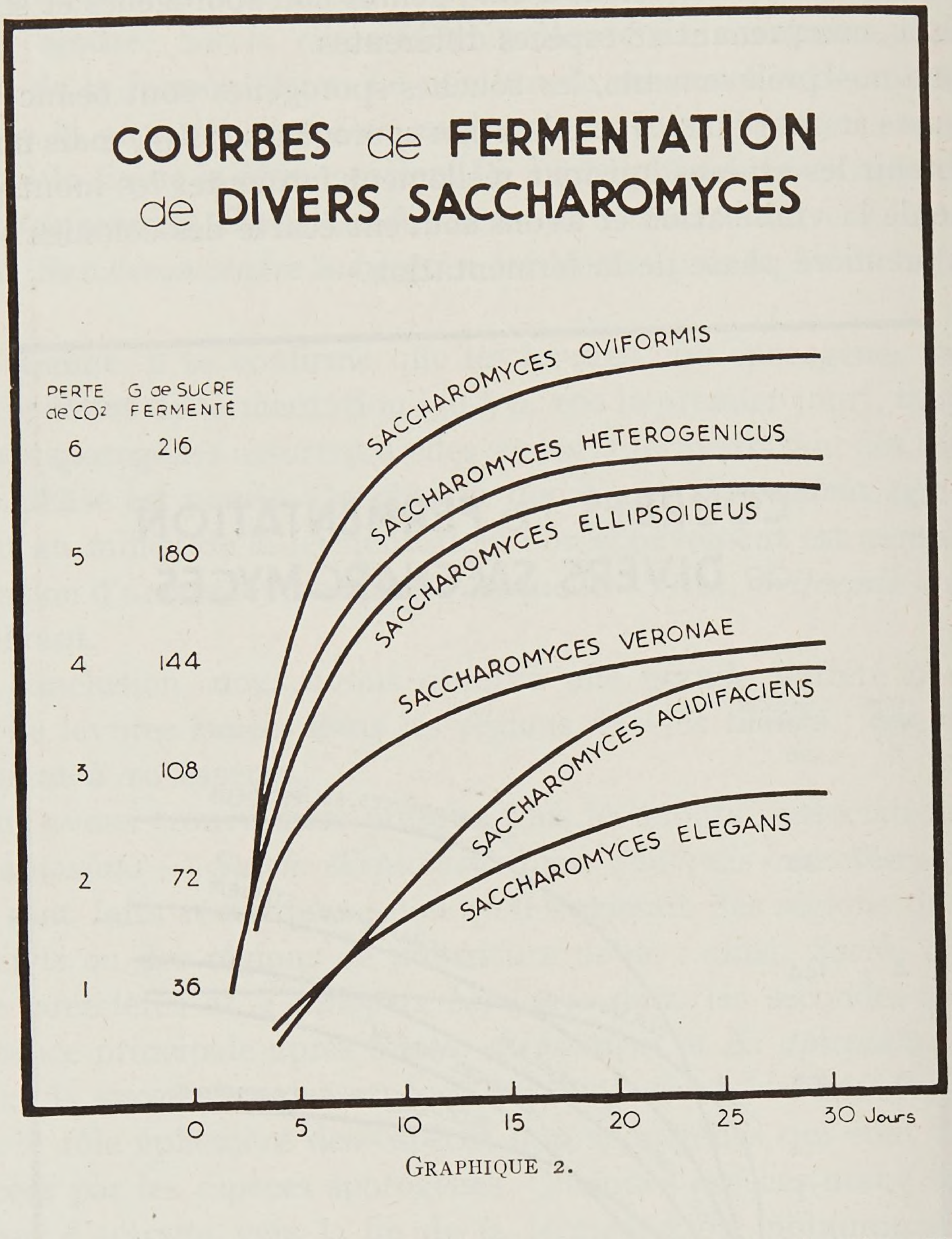
Ces levures appartiennent à cinq genres non sporogènes et six genres sporogènes, comprenant 28 espèces différentes.

Dans nos prélèvements, les souches sporogènes sont beaucoup plus nombreuses (1 300) que les souches non sporogènes (723) ; mais nous désirions obtenir les espèces qui font réellement fermenter les moûts dans la pratique de la vinification et avons souvent écarté des colonies obtenues dans la première phase de la fermentation.



Graphique 1.

Les espèces les plus répandues sont *Sacch. ellipsoïdeus* et *K. apiculata* qui groupent ensemble 78 p. 100 des souches. Ces deux espèces sont associées dans presque tous les moûts étudiés. Puis vient dans la classification de fréquence *Torulopsis bacillaris* avec 6,9 p. 100 des souches. La proportion remarquable de cette espèce dans le nombre total des souches provient des régions de vins blancs où elle a une importance très grande, tout particulièrement dans les régions de raisins « pourris noble ». *Sacch. oviformis, Sacch. chevalieri,* et *Torulaspora rosei* viennent ensuite dans l'ordre d'importance.

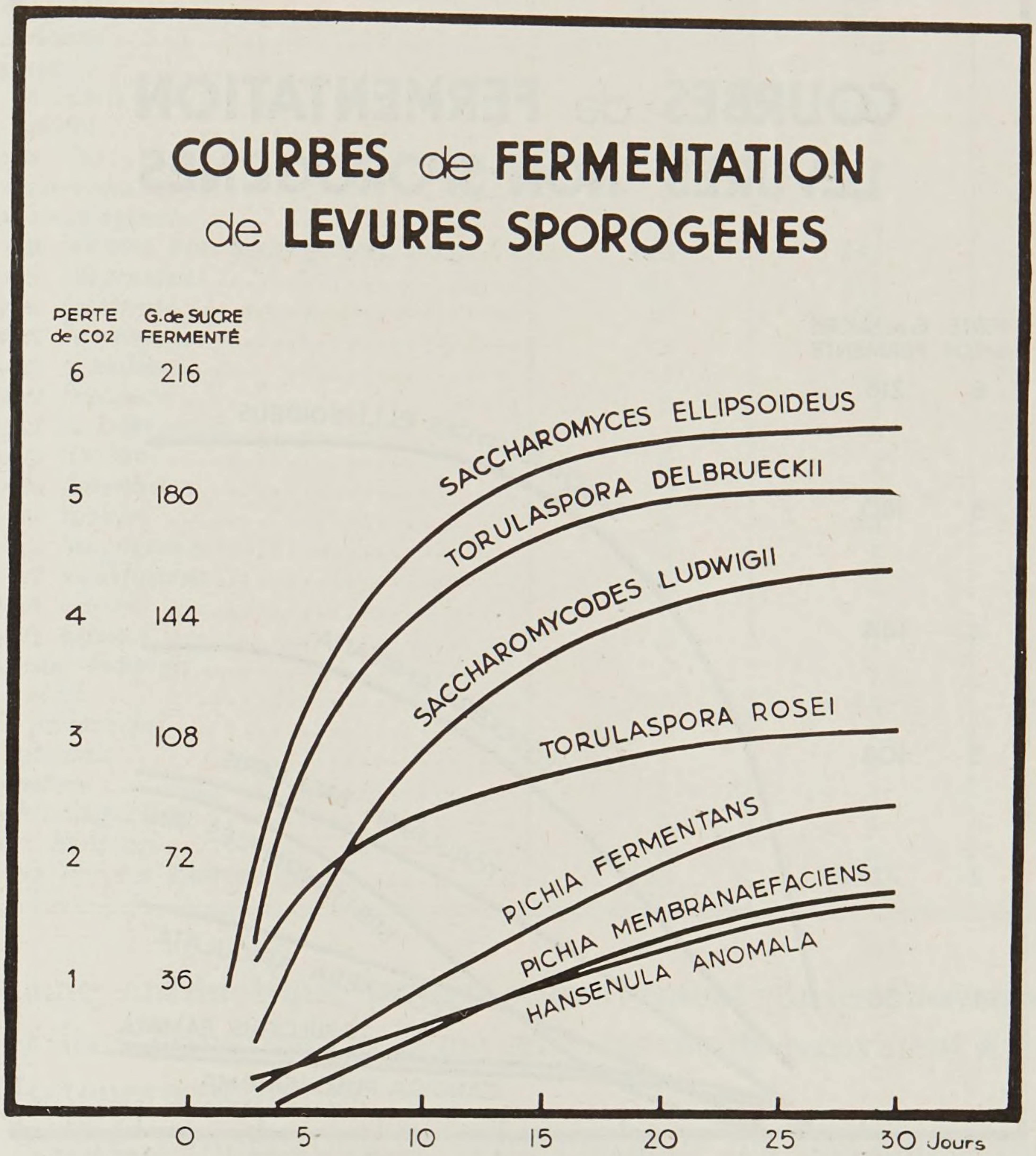


Graphique 2.

La description de ces espèces a été donnée dans le chapitre III ; nous avons réalisé des dessins et des photographies des levures les plus typiques, cultivées en milieux liquide et solide, examinées au bout de quelques jours, et au bout d'un mois de culture.

Enfin, d'après les données que nous possédons pour chaque souche, nous avons tracé les courbes de fermentation de ces espèces : elles tra-

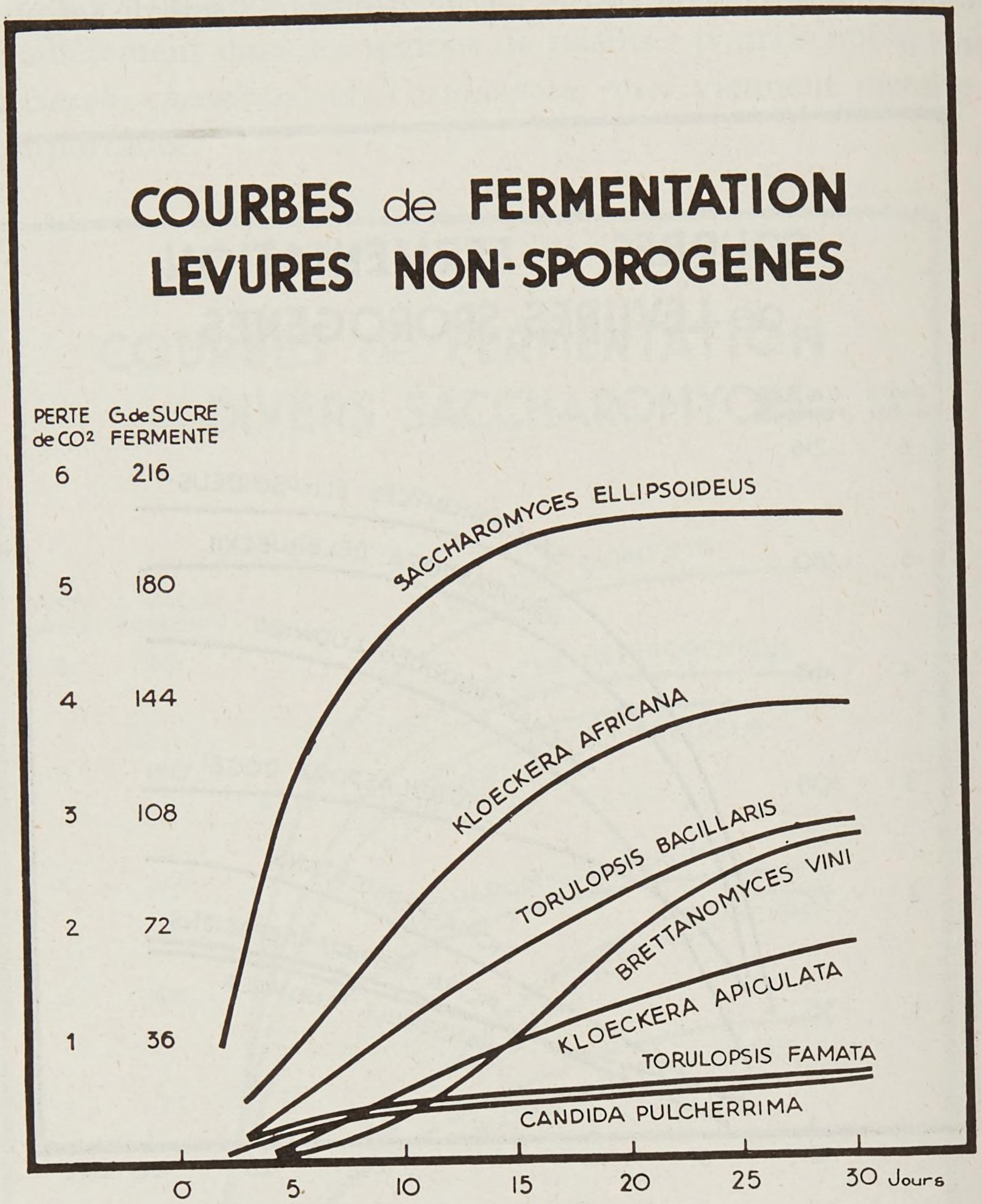
duisent les pertes de gaz carbonique enregistrées au cours de 30 jours, dans la fermentation d'un moût suffisamment riche en sucres, le même que celui qui a servi pour déterminer le pouvoir alcoogène et la formation d'acidité volatile. Nous avons réparti ces courbes en quatre graphiques, groupant les *Saccharomyces*, les espèces sporogènes, les espèces non sporogènes. Pour chacun, la courbe de *Sacch. ellipsoïdeus* sert de terme de comparaison.



GRAPHIQUE 3.

On observe, d'après ces courbes, que *Sacch. oviformis* est l'espèce qui fait fermenter le plus rapidement et le plus complètement le moût de raisin. Les autres *Saccharomyces* ont des courbes assez semblables entre elles : la fermentation dure plus ou moins longtemps et est conduite plus ou moins loin. Parmi les autres espèces sporogènes, *H. anomala* et *P. membranaefaciens* ont des courbes voisines : la fermentation se poursuit lentement avec une vitesse constante. *P. fermentans* forme davantage d'alcool. *T. rosei* provoque un départ de fermentation rapide, mais par la suite l'allure se ralentit. *Saccharomycodes ludwigii* a une courbe dont la forme rappelle celle de *Sacch. ellipsoïdeus*.

Parmi les espèces non sporogènes, *C. pulcherrima* et *T. famata* donnent des courbes se rapprochant d'une droite ; ce sont les espèces les moins alcoogènes. Les courbes de *K. apiculata*, *T. bacillaris* et *K. africana* font progressivement la transition avec celle de *Sacch. ellipsoïdeus* tandis que les *Brettanomyces vini* ont une courbe de fermentation particulière :



GRAPHIQUE 4.

le départ de la fermentation est très lent, puis vers le treizième jour, la vitesse s'accroît, la courbe présente un point d'inflexion et atteint très lentement un palier ; au bout de 30 jours, d'ailleurs, la fermentation n'est pas terminée et elle se poursuit encore plusieurs semaines.

Séparation des levures en présence d'alcool et d'actidione.

Au cours des vendanges de 1953, nous avons essayé d'augmenter la diversité des espèces isolées en additionnant le moût de produits ayant sur les levures une action sélective. Nous avons utilisé l'alcool à 4° qui empêche le développement des levures peu alcoogènes, telles les *Kloeckera*,

TABLEAU XVII

Tableau récapitulatif des souches isolées.

	Régions de vins rouges	Régions de vins blancs	Ensemble de la Gironde
Nombre de moûts étudiés	58	38	96
Nombre de souches isolées	1 070	953	2 023
Kloeckera apiculata	409	154	563
Kloeckera africana	1	0	1
Kloeckera jensenii	1	0	1
Torulopsis bacillaris	12	127	139
Torulopsis famata	5	0	5
Brettanomyces vini	4	0	4
Candida pulcherrima	6	0	6
Rhodotorula mucilaginosa	4	0	4
Total des levures non sporogènes	*442*	*281*	*723*
Saccharomyces ellipsoïdeus	501	517	1 018
Saccharomyces oviformis	18	76	94
Saccharomyces bayanus	3	0	3
Saccharomyces chevalieri	42	19	61
Saccharomyces fructuum	6	4	10
Saccharomyces carlsbergensis	3	8	11
Saccharomyces uvarum	6	1	7
Saccharomyces florentinus	5	1	6
Saccharomyces steineri	5	14	19
Saccharomyces heterogenicus	0	5	5
Saccharomyces acidifaciens	0	5	5
Saccharomyces elegans	0	4	4
Saccharomyces veronae	0	1	1
Saccharomycodes ludwigii	0	1	1
Torulaspora rosei	22	13	35
Torulaspora delbrueckii	0	1	1
Hansenula anomala	7	0	7
Pichia fermentans	3	1	4
Pichia membranaefaciens	2	1	3
Debaryomyces hansenii	5	0	5
Total des levures sporogènes	*628*	*672*	*1 300*

et l'actidione, antibiotique qui agit sélectivement sur les *Saccharomyces*, à 10 mg par litre. Dans une troisième série, les moûts recevaient à la fois ces deux inhibiteurs spécifiques.

En réalité, l'application de cette méthode n'a pas donné tout à fait les résultats qu'on en attendait : l'actidione ayant surtout une action fongistatique n'est efficace sur les *Saccharomyces* qu'avant le départ de la fermentation ; si elle est déjà en cours, l'actidione n'a plus aucune action inhibitrice et les *Saccharomyces* continuent à se développer. C'est ainsi que nous avons obtenu des *Saccharomyces* en présence d'actidione ou d'actidione et d'alcool.

D'autre part, l'addition combinée ayant empêché à la fois la multiplication de *K. apiculata* et de *Sacch. ellipsoïdeus*, il ne devait plus rester dans le moût qu'un très petit nombre de levures fermentatives, et les bactéries acétiques se sont abondamment développées pendant la période de latence des levures, en formant un voile épais. Dans ce cas, on ne peut obtenir de levures qu'en effectuant les prélèvements dans le moût, peu de

temps après l'addition de l'alcool et de l'actidione. Ces développements de bactéries ont beaucoup réduit le nombre des souches de levures isolées en présence d'actidione. Cependant on a recueilli 124 souches dans ces conditions, 265 en présence d'alcool et 103 quand ces deux produits sont utilisés simultanément (tableau XVIII).

TABLEAU XVIII

Isolements de levures en présence d'alcool et d'actidione.

	4 p. 100 alcool 265 souches	10 mg/l actidione 124 souches	4 p. 100 alcool 10 mg/l actidione 103 souches
Kloeckera apiculata	0,8	53,2	8,7
Torulopsis bacillaris	6,1	15,3	39,4
Candida mycoderma	0,8	16,9	24,6
Saccharomyces ellipsoïdeus	83,4	9,7	13,6
Saccharomyces oviformis	2,3	0	0,9
Saccharomyces chevalieri	1,9	0	0,9
Saccharomyces fructuum	0,4	0	0
Saccharomyces carlsbergensis	0,4	0	0
Saccharomyces florentinus	0	0	0,9
Saccharomyces steineri	1,1	0	0
Saccharomyces heterogenicus	0,4	0	0
Saccharomyces acidifaciens	0	0	0,9
Saccharomyces elegans	0,8	0	0,9
Torulaspora rosei	1,1	4,2	8,7
Pichia fermentans	0	0	0,9
Pichia membranaefaciens	0	0,8	0

En dépit de ces difficultés, nous avons pu observer que l'addition d'alcool élimine à peu près complètement *K. apiculata* et *C. mycoderma*; les *Pichia* disparaissent tout à fait. Ont continué à se développer : les *Saccharomyces*, *T. bacillaris* et *Torulaspora rosei*. L'addition de 10 mg d'actidione fait apparaître la résistance à cet antibiotique de *K. apiculata*, de *T. bacillaris* et *C. mycoderma*. *T. rosei* supporte mieux l'actidione que l'alcool. Quelques souches de *Sacch. ellipsoïdeus* ont également résisté parce que la fermentation était déjà en cours au moment de l'addition.

Le mélange d'alcool et d'actidione a permis surtout le développement de *T. bacillaris* et de *C. mycoderma*.

Répartition des levures.

Nous avons observé que les levures sont relativement rares sur les raisins et que leur nombre croît à mesure que la vendange est soumise aux manipulations.

Mais la composition de la microflore se modifie aussi dans le temps : certaines espèces, prépondérantes sur les raisins, disparaissent au cours de la fermentation. Il serait intéressant de savoir ce que deviennent par exemple les cellules des *K. apiculata* qui après avoir dominé la fermenta-

tion pendant les premiers jours, disparaissent dès que les *Saccharomyces* se multiplient.

D'autres espèces à peine représentées sur les raisins, apparaissent au cours de la fermentation, et arrivent parfois à une importance remarquable vers la fin de cette transformation. C'est le cas de *Sacch. oviformis* : cette levure fortement alcoogène termine la fermentation ; elle présente un grand intérêt en œnologie car c'est elle, le plus souvent, qui fait disparaître les dernières traces de sucre. D'autre part, elle est capable de résister à des doses importantes d'acide sulfureux ; et c'est une de celles qui produisent les refermentations des vins sucrés, lorsque l'acide sulfureux libre est insuffisant dans le vin (voir chapitre VII).

Quelques espèces, secondaires par leur nombre dans la microflore, présentent cependant un certain intérêt au point de vue œnologique. *Torulaspora rosei* a un bon pouvoir alcoogène (jusqu'à 12° et 13°) et forme très peu d'acidité volatile (0 à 0,30 g au maximum). Ces propriétés ont d'ailleurs attiré l'attention des chercheurs italiens (11) qui conseillent son emploi dans les vinifications avec ferments sélectionnés, en l'associant parfois avec d'autres espèces, associations simultanées ou au contraire échelonnées.

Torulopsis bacillaris est une levure très courante dans les régions de vins blancs, et surtout dans celles où le *Botrytis cinerea* se développe. Cette levure, de qualité moyenne quant à la production d'alcool et d'acidité volatile, utilise de préférence le fructose au glucose, propriété assez rare. De plus, sa présence sur les moûts riches en sucre, provenant de raisins attaqués par la pourriture noble, confirme le fait observé par KROEMER et KRUMBHOLZ en 1931 (61), pour la souche de *T. bacillaris* qu'ils avaient isolée sur des raisins et qui était adaptée à une concentration élevée en sucre (60 p. 100).

Sacch. acidifaciens n'est pas une espèce très courante dans les moûts de raisins (2,3 p. 1 000 des souches, 3 p. 100 des moûts) ; néanmoins elle a quelques propriétés caractéristiques. Dans des fermentations anaérobies elle ne produit pas une acidité exagérée dans le milieu de culture, bien qu'elle soit très succinogène, mais nous avons observé qu'elle utilise le fructose de préférence au glucose, comme le fait *T. bacillaris* (et par ailleurs *Sacch. elegans*). Cette levure est capable de supporter de grandes quantités d'acide sulfureux. FEDUCHY et MARCILLA (61) avaient isolé une telle levure d'un moût sulfité, et l'avaient nommée *Saccharomycodes mestris*. LODDER et K. VAN RIJ l'ont assimilée à *Sacch. acidifaciens*, comme nous avons pu le confirmer nous-même par comparaison avec la souche authentique que nous devons à l'amabilité du professeur FEDUCHY.

Nous avons trouvé quelques souches de *Brettanomyces vini*. Leur présence n'est pas seulement accidentelle, car nous les avons isolées dans deux communes assez éloignées. Il s'agit bien d'une espèce nouvelle,

car elle ne correspond pas à la description des espèces connues de *Brettanomyces*, isolées jusqu'alors dans la bière. Mais elle se rapproche beaucoup de quelques autres souches, isolées dans des vins d'Arbois et des vins mousseux allemands.

Saccharomycodes ludwigii a été observé une fois à la fin de la fermentation d'un moût de vin blanc. Cette espèce a un bon pouvoir alcoogène et forme, avec une acidité volatile non exagérée, un taux élevé d'acétate d'éthyle qui donne aux produits fermentés par cette levure le caractère de la piqûre. La résistance de cette levure à l'acide sulfureux a été signalée. Cette levure est particulièrement dangereuse pour la conservation des vins. Nous en verrons les conséquences dans le chapitre suivant.

Un certain nombre d'espèces n'ont qu'un rôle accessoire, les unes parce qu'elles ont un pouvoir fermentatif faible ou nul comme *Candida pulcherrima* et *Rhodotorula mucilaginosa*, les autres parce qu'elles sont rarement présentes dans les moûts ; certaines peuvent former des voiles superficiels plus ou moins importants et se distinguent par une production d'esters dont l'odeur reconnaissable influe sur le bouquet du vin (*Hansenula*, *Pichia*).

Comparaison avec les résultats des chercheurs italiens.

Notre étude ayant suivi les grandes lignes des recherches italiennes, nous avons comparé nos résultats avec ceux qui ont été obtenus par CASALE et MENSIO, CAPRIOTTI et CANTARELLI, MALAN (15, 13, 14, 64) en Italie du Nord. En effet, la région bordelaise se trouve à peu près à la même latitude que le Piémont et la Vénétie. CASTELLI a reconnu que la microflore de ces régions est assez différente de celle qu'il avait observée avec ses collaborateurs dans l'Italie centrale et méridionale, ainsi qu'en Sicile et en Sardaigne, ce qui met en valeur l'influence du climat sur la microflore.

Nous avons retrouvé dans la région bordelaise les caractères principaux des levures de l'Italie septentrionale.

La fermentation est toujours commencée par les levures non sporogènes, *K. apiculata*, qui cèdent rapidement le terrain devant l'envahissement du milieu par les *Sacch. ellipsoïdeus*. Ce sont ces deux espèces de levures, présentes dans 90 à 100 p. 100 des moûts, qui contrôlent la fermentation. Par la suite, d'autres espèces apparaissent et se succèdent au cours de la fermentation qui est généralement terminée avec le concours de *Sacch. oviformis*.

Les espèces sporogènes et non sporogènes sont en nombre à peu près égal. Cet équilibre dépend du climat et varie avec la latitude. Dans l'Italie méridionale, les espèces présentes sont presque en totalité sporogènes, les levures apiculées elles-mêmes ne sont plus des *K. apiculata*,

mais des *Hanseniaspora* ; vers le 45e degré de latitude, ces espèces sont au contraire absentes, en Italie comme en France.

Les autres espèces, présentes moins souvent ou en moins grandes quantités, mais qui jouent encore un rôle certain dans la fermentation sont : *Sacch. oviformis*, *Sacch. chevalieri* et *Torulaspora rosei*. En Vénétie, CAPRIOTTI a trouvé de nombreuses souches d'une levure fermentant tous les sucres et complètement le raffinose, qu'il appelle *Sacch. pastorianus*. LODDER et K. VAN RIJ ont décrit cette levure sous le nom de *Sacch. uvarum* et nous en avons trouvé pour notre part 7 souches en Gironde. CAPRIOTTI signale encore *Torulopsis bacillaris* avec un pourcentage important, comme nous l'avons nous-mêmes observé en Gironde.

Le pouvoir alcoogène des levures est assez bien en rapport avec le climat.

Dans les régions septentrionales d'Italie, CASALE et MENSIO ont trouvé que *K. apiculata* forme moins de 6° d'alcool, tandis que des concentrations plus élevées sont observées dans les régions méridionales. CAPRIOTTI et CANTARELLI ont noté également que les pouvoirs alcoogènes des levures de la région de Trévise sont d'une façon générale nettement inférieurs à ce qu'ils sont plus au sud.

De même, *K. apiculata* dans la région bordelaise a un pouvoir alcoogène généralement inférieur à 5°. Cependant, parmi les *Saccharomyces*, nous avons isolé des souches qui atteignent et dépassent même 18°.

En définitive, il existe donc une ressemblance certaine quant à la microflore levurienne, entre les régions viticoles d'Italie du Nord et la région bordelaise se trouvant à une même latitude.

Influence du milieu.

Un phénomène d'adaptation des levures à la nature du moût fermenté peut être également mis en évidence. La microflore des moûts provenant de raisins pourris est assez différente de celle des moûts sains. Le *Botrytis cinerea* dont le développement exige des conditions précises d'ensoleillement et d'humidité, modifie beaucoup la composition des moûts. Il provoque la concentration du raisin par perte d'eau, produit du glycérol, fait passer dans le moût des quantités notables de dextrane, brûle l'acide tartrique, épuise le milieu en substances azotées, etc.. Le moût obtenu, très riche en sucre, a une pression osmotique élevée ; il convient mal à la multiplication de certaines levures, d'autant plus que *Botrytis cinerea* sécrète une substance antibiotique la botryticine, qui a été découverte et étudiée par S. LAFOURCADE (57).

La microflore des raisins pourris est effectivement différente de celle des raisins sains. *Torulopsis bacillaris* provoque ici le départ de la fermen-

tation au même titre que *K. apiculata* et parmi les levures sporogènes *Sacch. oviformis* est particulièrement répandu.

Il est certain que les espèces caractéristiques qu'on trouve dans ces régions sont sélectionnées par suite d'une adaptation à un milieu particulier.

Dans l'ensemble de notre travail les moûts que nous avons étudiés provenaient de 90 propriétés vinicoles. Les vins issus de ces vignobles n'ont pas la même qualité ni la même valeur marchande, mais nous n'avons pas trouvé que ces différences soient un reflet des variations de la composition de la microflore. Dans quelques cas particuliers, nous avons seulement observé que les levures les plus alcoogènes provenaient des régions et des crus dont les vins ont les degrés alcooliques les plus élevés. Il y a semble-t-il une sorte d'adaptation des souches de levures, entraînées à travailler sur des moûts de grande richesse sucrée. C'est là le seul caractère qui nous a paru lié au terroir.

Chapitre VII

LEVURES ISOLÉES DE VINS

On observe assez souvent dans la pratique de la conservation des vins, des développements de levures troublant la limpidité et formant des dépôts ; lorsque les vins contiennent suffisamment de sucres réducteurs, il peut se déclarer une véritable fermentation et le vin devient gazeux. Ces accidents s'observent durant la conservation en cuves, en barriques et en bouteilles. D'autre part, il arrive dans les vins liquoreux que, malgré des additions répétées d'acide sulfureux, des levures se développent et combinent peu à peu cet antiseptique. Ces accidents de refermentation des vins sucrés posent des problèmes difficiles de conservation au producteur et au négociant.

Il nous a donc paru très important d'identifier et d'étudier les espèces de levures qui restent vivantes dans les conditions habituelles de conservation et qui sont à l'origine de ces refermentations. Ces levures résistent tout particulièrement à l'alcool et à l'anhydride sulfureux. Une première étude a été publiée sur ce sujet (82), mais nous l'avons complétée depuis par un grand nombre d'observations.

Nous avons étudié 70 échantillons de vins rouges ou blancs, d'âge et d'origine divers, provenant de chais de producteurs ou de négociants, dans lesquels des développements de levures étaient apparus. Différentes lies ont été encore examinées ainsi que des moûts de raisin concentrés, et en marge de ce travail, un sirop de cassis contenant 850 g de sucre par litre et donnant des signes de fermentation.

Technique de prélèvement.

On ensemence des tubes de moût de raisin stérilisé avec du vin à examiner ou avec son dépôt ; on peut avoir intérêt à centrifuger si le vin contient peu de levures. Quand la fermentation s'est déclarée, on prépare une boîte de Pétri de moût gélatiné selon la technique habituelle. Quand le développement des colonies est suffisant, on prélève 3 colonies avec un fil de platine.

Chaque échantillon nous a ainsi donné trois souches, qui ont été soumises aux tests décrits dans le chapitre II. Le nombre de colonies prélevé peut paraître faible, mais il est suffisant. Nous avons observé que le nombre d'espèces de levures capables de faire fermenter un vin est assez réduit et que la plupart du temps les refermentations des vins sont conduites par une seule espèce, plus rarement par deux. Alors que dans la fermentation d'un moût un grand nombre d'espèces de levures interviennent, la fermentation d'un vin peut être considérée le plus souvent comme une fermentation pure.

Levures isolées.

Les tableaux XIX et XX reprennent un à un les cas examinés, et énumèrent les espèces isolées ; nous y faisons figurer les degrés alcooliques moyens que les souches sont capables d'atteindre et les acidités volatiles qu'elles forment. Le tableau XXI récapitule ces résultats et donne, par espèce, le nombre de souches trouvées.

Si l'on excepte les examens des échantillons de sirops, moûts de raisins concentrés, lies diverses, qui seront envisagés plus loin, 207 souches de levures ont été recueillies provenant de 70 échantillons de vins. Ces souches appartiennent à 3 genres différents et à 9 espèces.

Ce sont surtout les *Saccharomyces* qui sont représentés. *Sacch. oviformis* est l'espèce prédominante, en particulier si l'on considère les vins blancs ; elle constitue 37 p. 100 des souches. On a déjà vu que cette levure devient prépondérante à la fin de la fermentation ; sa résistance à l'alcool lui permet de faire fermenter les dernières traces de sucre et on comprend qu'elle résiste aux conditions de la conservation. *Sacch. acidifaciens*, levure résistant à l'acide sulfureux, forme 26 p. 100 des souches. Il semble que *Sacch. oviformis* cause surtout la refermentation des vins à degré alcoolique élevé et que *Sacch. acidifaciens* fasse plus couramment fermenter les vins sulfités de degré moyen. *Sacch. ellipsoïdeus* ne vient qu'au troisième rang avec 16,5 p. 100 des souches et on ne note que 5 cas de refermentation par cette levure, la plupart se rapportant à des vins jeunes.

TABLEAU XIX

Levures isolées de vins rouges

Origine	Millésime	Dates des prélèvements	Souches isolées	Degré moyen	Acidité volatile moyenne
			Vins conservés en fûts		
Saint-Julien	1952	5-1953	3 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°9	1,90
Pomerol	1952	10-1953	3 *Sacch. chevalieri.*	15°0	1,04
			1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°7	1,53
Saint-Caprais (hybrides) ...	1953	12-1953	4 *Sacch. ellipsoïdeus.*	—	—
			1 *Sacch. carlsbergensis.*	12°1	0,73
Soussans	1953	6-1954	3 *Sacch. ellipsoïdeus.*	15°3	1,85
Bordeaux	1953	7-1954	3 *Sacch. oviformis.*	14°8	1,73
			1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°0	1,71
Saint-Caprais	1955	11-1955	3 *Sacch. acidifaciens.*	—	—
Lie de vin du Médoc..	1953	5-1954	2 *Sacch. ellipsoïdeus.*	18°5	1,34
			1 *Sacch. oviformis.*	18°6	1,56
Lie de filtre	—	8-1955	3 *Sacch. oviformis.*	—	—
Dépôt sur bondes	1953	4-1954	3 *Sacch. ellipsoïdeus.*	15°5	1,59
			1 *Sacch. elegans.*	9°0	0,70
			Vins conservés en bouteilles		
Saint-Émilion	1945	1-1953	4 *Sacch. elegans.*	9°4	1,59
Vin rouge	—	6-1953	2 *Sacch. oviformis.*	18°9	1,56
Bordeaux C	1951	4-1953	2 *Sacch. acidifaciens.*	—	—
Clairet C	1952	9-1953	3 *Brett. schanderlii.*	8°0	—
Ordonnac............	1950	12-1953	3 *Sacch. oviformis.*	18°2	1,59
Saint-Émilion	1950	5-1954	3 *Sacch. oviformis.*	17°0	1,44
Saint-Émilion	1953	5-1954	3 *Sacch. heterogenicus.*	12°5	0,46
Clairet	1952	7-1954	2 *Sacch. oviformis.*	17°4	1,42
			1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	—	—
Côtes du Rhône	—	10-1954	3 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°7	1,80
Saint-Émilion	1949	1-1955	2 *Sacch. oviformis.*	15°4	1,41
			1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	15°2	1,47
Pomerol	1950	10-1955	3 *Sacch. heterogenicus.*	—	—

Saccharomycodes ludwigii, dont aucun exemplaire n'a été rencontré dans les vins rouges, est responsable de près de 15 p. 100 des cas de refermentation des vins blancs. C'est une levure spécifique des vins blancs sulfités. Rencontrée une seule fois à la fin de la fermentation d'un moût de raisins blancs, elle est par contre très courante dans les vins blancs sucrés conservés avec de l'acide sulfureux. Dans ces vins son développement revêt une forme caractéristique : elle constitue des amas de levures, ressemblant à des flocons, difficiles à désagréger par agitation. Les cellules se multiplient à l'intérieur de ces flocons, d'où part de temps en temps une bulle de gaz carbonique. Les cellules de la périphérie combinent l'acide sulfureux par production d'éthanal et protègent ainsi les levures du centre. La fermentation se généralise lorsque la teneur en acide sulfureux libre est tombée au voisinage de zéro.

Les autres espèces *Sacch. chevalieri*, *Sacch. carlsbergensis*, *Sacch.*

Tableau XX

Levures isolées de vins blancs

Vins conservés en cuves prélevés dans les chais de négociants.

N°	Dates des prélèvements	Souches isolées	Degré moyen	Acidité volatile moyenne
1	6-1954	3 *Sacch. acidifaciens.*	9°9	1,10
2	—	2 *Sacch. oviformis.*	15°1	1,57
		1 *Sacch. acidifaciens.*	9°4	0,89
3	—	3 *Sacch. acidifaciens.*	9°9	1,14
4	—	3 *Sacch. acidifaciens.*	10°2	1,14
5	—	3 *Sacch. acidifaciens.*	9°9	1,08
6	—	3 *Sacch. acidifaciens.*	9°3	0,93
7	—	3 *Sacch. acidifaciens.*	10°7	0,89
8	—	3 *Sacch. acidifaciens.*	10°2	0,92
9	—	3 *Sacch. acidifaciens.*	10°2	1,07
10	—	3 *Sacch. acidifaciens.*	8°9	0,92
11	—	3 *Sacch. acidifaciens.*	9°9	1,09
12	—	3 *Saccharomycodes ludwigii.*	10°5	0,76
13	—	3 *Saccharomycodes ludwigii.*	10°8	0,71
14	—	3 *Sacch. acidifaciens.*	8°9	1,42
15	—	3 *Sacch. oviformis.*	14°2	1,63
16	9-1954	3 *Sacch. oviformis.*	12°3	1,86
17	—	2 *Sacch. oviformis.*	13°7	1,73
		1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	11°8	2,02
18	—	3 *Sacch. oviformis.*	13°6	2,01
19	—	2 *Saccharomycodes ludwigii.*	11°6	1,38
		1 *Sacch. oviformis.*	12°5	1,50
20	—	2 *Saccharomycodes ludwigii.*	10°4	0,98
		1 *Sacch. oviformis.*	14°5	1,77
21	—	3 *Sacch. oviformis.*	13°1	2,08
22	—	3 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°5	1,69
23	—	1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°9	2,14
		2 *Sacch. oviformis.*	13°2	2,02

heterogenicus, *Sacch. elegans* et *Brettanomyces schanderlii* n'ont été rencontrées qu'un petit nombre de fois et presque toujours dans des vins rouges. Huit espèces ont été identifiées dans ces vins. La microflore des vins rouges qui refermentent est plus variée que celle des vins blancs. On note dans les vins rouges en fûts au cours de la première année une proportion importante de *Sacch. ellipsoïdeus* (55 p. 100) et peu de *Sacch. oviformis*. Dans les vins rouges en bouteilles au contraire, *Sacch. oviformis*, plus résistant, forme 37 p. 100 des souches ; de même on ne trouve *Sacch. elegans* que dans les vins en bouteilles.

Brettanomyces schanderlii a été rencontré une fois, dans un « clairet », conservé en bouteille, où trois souches identiques ont été isolées. Ces trois souches répondaient assez approximativement à la description de *T. delbrueckii*, mais comme nous n'avons pu observer de spores, nous les avons classées parmi les espèces non sporogènes. De plus les courbes de fermentation de ces souches sont très différentes de celles de *T. delbrueckii* et ressemblent par contre à celles des *Brettanomyces*, car elles présentent un point d'inflexion au bout du même temps. La seule espèce de *Bretta-*

TABLEAU XX *(suite)*

Origine	Millésime	Dates des prélèvements	Souches isolées	Degré moyen	Acidité volatile moyenne
			Vins blancs conservés en fûts		
Saint-Caprais	—	9-1953	2 *Sacch. oviformis.*	18°3	1,36
Bordeaux supérieur ...	—	9-1953	2 *Sacch. ellipsoïdeus.*	18°3	1,25
L. G.	—	3-1954	2 *Sacch. ellipsoïdeus.*	16°9	1,52
			1 *Sacch. oviformis.*	16°6	1,53
A..................	—	5-1954	3 *Sacch. oviformis.*	17°9	1,65
L	—	5-1954	2 *Sacch. oviformis.*	13°3	1,95
			1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°8	1,96
Saint-Maixent	1953	6-1954	3 *Sacch. oviformis.*	18°4	1,52
Cambes		12-1954	3 *Sacch. acidifaciens.*	9°4	1,60
Martillac	1953	12-1954	2 *Sacch. oviformis.*	14°4	1,50
			1 *Sacch. heterogenicus.*	13°5	1,65
Graves sec	1954	1-1955	3 *Sacch. acidifaciens.*	9°4	1,38
Graves doux	1954	1-1955	3 *Sacch. acidifaciens.*	9°1	1,43
Villefranche n° 8	1953	11-1954	3 *Sacch. oviformis.*	12°3	1,91
Villefranche n° 9	1953	11-1954	3 *Sacch. acidifaciens.*	9°2	1,38
Sainte-Croix-du-Mont n° 1	1953	12-1954	2 *Sacch. oviformis.*	14°2	1,87
			1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	15°3	1,83
Sainte-Croix-du-Mont n° 2	1953	12-1954	2 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°5	1,70
			1 *Sacch. oviformis.*	10°8	1,77
			Vins blancs conservés en bouteilles		
C		5-1954	3 *Saccharomycodes ludwigii.*	13°9	—
L		5-1954	2 *Sacch. elegans.*	9°7	1,83
			1 *Sacch. acidifaciens.*	9°7	1,10
N		5-1954	3 *Saccharomycodes ludwigii.*	12°9	1,09
VBL		5-1954	3 *Sacch. oviformis.*	14°5	0,73
Bordeaux supérieur ...		7-1954	3 *Sacch. oviformis.*	13°6	1,62
Premières Côtes	1952	7-1954	3 *Sacch. oviformis.*	14°2	2,15
Premières Côtes	1953	10-1954	1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°3	1,62
			2 *Sacch. oviformis.*	14°8	1,62
Haut Montravel......	1952	10-1954	1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°6	1,53
			2 *Sacch. oviformis.*	14°6	1,96
A..................		7-1954	3 *Saccharomycodes ludwigii.*	10°6	0,98
Bordeaux		9-1954	1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°6	1,25
			2 *Sacch. oviformis.*	14°8	1,41
Graves supérieures ...	1953	2-1955	1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°9	1,41
			2 *Sacch. oviformis.*	14°6	1,35
Bourgogne n° 1		9-1955	3 *Sacch. oviformis.*	—	—
Bourgogne n° 2		9-1955	3 *Sacch. oviformis.*	—	—
Bordeaux L		2-1955	3 *Saccharomycodes ludwigii.*	9°1	0,83
Bordeaux D		11-1955	1 *Candida mycoderma.*	—	—
			1 *Sacch. acidifaciens.*	—	—
Moût de raisin concentré 24°B		7-1954	3 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°5	1,43
Moût de raisin concentré 36°B		9-1955	3 *Sacch. rouxii.*	—	—
Sirop de cassis		5-1954	3 *Sacch. rouxii.*	13°2	0,09

nomyces qui fait fermenter le glucose et le galactose est *Brettanomyces schanderlii* que nous avons ainsi appelée (83) parce qu'elle a d'abord été isolée par le professeur SCHANDERL d'un vin mousseux allemand. Malgré quelques différences notamment dans la forme des cellules, nous avons donc assimilé nos trois souches à *Brettanomyces schanderlii*.

TABLEAU XXI

Tableau récapitulatif des levures de vin

	Isolées de vins rouges	Isolées de vins blancs	Totaux
Nombre de vins examinés	17	53	70
Nombre de souches isolées	*54*	*153*	*207*
Sacch. ellipsoïdeus	17	17	34
Sacch. oviformis	15	62	77
Sacch. chevalieri	3	0	3
Sacch. carlsbergensis	1	0	1
Sacch. heterogenicus	6	1	7
Sacch. acidifaciens	5	49	54
Sacch. elegans	4	2	6
Saccharomycodes ludwigii	0	22	22
Brettanomyces schanderlii	3	0	3

Pour les vins blancs, les degrés plus élevés que l'on atteint dans une certaine catégorie de vins liquoreux, et l'emploi généralisé de l'acide sulfureux limitent le nombre des espèces et sélectionnent les plus résistantes. C'est ainsi qu'on note la prépondérance de *Sacch. oviformis* avec 41 p. 100 et la présence très fréquente de *Sacch. acidifaciens* (32 p. 100), alors que cette levure était absente des vins rouges. En fait ce sont ces trois levures qui sont responsables dans les vins blancs de la majorité des accidents et qui doivent être considérées comme de véritables levures de maladie.

La classification suivant les conditions de conservation montre que les levures qui se maintiennent longtemps dans les cuves sont surtout *Sacch. acidifaciens* (49 p. 100 des souches), puis *Sacch. oviformis* (29 p. 100) et *Saccharomycodes ludwigii* (14 p. 100). En fûts, *Sacch. oviformis* prédomine (47 p. 100), tandis que *Sacch. acidifaciens* représente encore 30 p. 100 des cas. Enfin les espèces qui provoquent la fermentation en bouteilles et souvent plusieurs mois après la mise, sont *Sacch. oviformis* (dans plus de la moitié des cas) et *Saccharomycodes ludwigii* (27 p. 100).

En résumé, on trouve dans les vins rouges la plupart des levures de fin de fermentation, tandis que dans les vins blancs on ne trouve qu'un petit nombre d'espèces de levures plus résistantes, en particulier à l'acide sulfureux. Les levures trouvées dans les vins rouges restés sucrés sont des levures finisseuses et leur présence est utile à l'achèvement du vin ; les levures trouvées dans les vins blancs sucrés constituent, par contre, un danger pour leur conservation et il convient de mettre en œuvre tous les moyens pour s'en débarrasser.

Observations diverses.

Nous avons rassemblé dans un autre groupe des échantillons de provenances diverses qui ont permis de séparer une vingtaine de souches de levures. Dans la lie d'un vin vieux du Médoc, nous avons trouvé *Sacch.*

ellipsoïdeus et *Sacch. oviformis*. Dans les dépôts de consistance grasse qui se forment souvent sur le dessus des fûts, dans la partie restant humide, autour des trous de bonde, nous avons trouvé *Sacch. ellipsoïdeus* et à plusieurs reprises, *Sacch. elegans*.

Trois produits très riches en sucre ont été également étudiés. Dans un moût de raisin concentré à 24° Baumé, nous n'avons trouvé que *Sacch. ellipsoïdeus*. Par contre dans un moût sirupeux à 36° Baumé et dans un sirop de cassis à 850 g de sucre par litre, nous avons identifié des souches de *Sacch. rouxii*. Cette espèce qui, avant LODDER et K-VAN RIJ était classée dans le genre *Zygosaccharomyces*, est bien connue pour ses propriétés osmophiles. Elle a la possibilité de se développer dans des milieux très concentrés en sucre ou en sels, à pression osmotique élevée.

CONCLUSIONS

Nous avons isolé au cours de trois vendanges successives (1951-1952-1953), 2023 souches de levures provenant de raisins et de moûts de raisin en fermentation, prélevés dans 96 propriétés et crus de la région bordelaise. L'identification et la classification de ces souches, qui nous ont demandé cinq années de travail, ont permis de distinguer, uniquement parmi les levures douées du pouvoir de faire fermenter le moût de raisin, 28 espèces différentes appartenant à 11 genres. Nous avons caractérisé 5 genres non sporogènes, représentant 723 souches, et 6 genres sporogènes, représentant 1 300 souches.

Les méthodes de prélèvement, d'isolement, de culture, d'identification et de classification que nous avons employées, sont les méthodes classiques, codifiées et décrites dans la monographie de LODDER et KREGER-VAN RIJ. Nous avons utilisé plus particulièrement les techniques employées par le Professeur CASTELLI, de l'Institut microbiologique de la Faculté de Pérouse.

Nous n'avons eu à procéder qu'à des modifications de détail, qui ne sont pas cependant sans intérêt. Nous avons vu la nécessité d'étudier non seulement la microflore des raisins prélevés aseptiquement à la vigne, mais encore du moût ou de la vendange en fermentation dans les fûts et dans les cuves. Il fut très instructif d'étudier les levures qui restent dans le vin après plusieurs mois et même plusieurs années de vieillissement. Nous avons également apporté beaucoup de soins à suivre dans le déroulement de la fermentation, *la succession et le relai* des différentes espèces de levures. Nous pensons que ces observations éclairent mieux le processus fermentaire dans les conditions de la pratique et de la conservation des vins.

En ce qui concerne les descriptions morphologiques, nous nous sommes soumis aux règles habituelles, mais nous avons tenu à donner, en plus

des dessins qui schématisent les cellules de levure, des photographies à fort grossissement obtenues au microscope à contraste de phase, pour les espèces les plus caractéristiques.

Les tests de fermentation des divers sucres ont été conduits avec la méthode classique ; cependant, à la fin de notre étude et à la suite des travaux de Madeleine LAFON à ce sujet, il nous a semblé qu'il serait facile de les rendre plus rapides et tout à fait sûrs, par des mesures manométriques effectuées à l'appareil de WARBURG. On a intérêt encore à suivre la fermentation du raffinose par le dosage final des sucres réducteurs, à l'aide de la liqueur de FEHLING, pour déterminer si la levure est capable ou non de faire fermenter le mélibiose. Dans le même ordre d'idée, la liquéfaction de la gélatine, qui n'est pas à vrai dire une propriété déterminante pour la classification, pourrait être mesurée par formoltitration des acides aminés libérés par la protéase des levures et devenir ainsi un test plus rigoureux.

Enfin nos recherches étant conduites surtout dans un but œnologique, nous avons toujours déterminé le pouvoir alcoogène des souches isolées, ainsi que la quantité d'acide acétique qu'elles forment au cours de la fermentation. Nous avons tracé pour chaque souche les courbes de fermentation du sucre en fonction du temps. Enfin, nous avons encore comparé pour chaque espèce la fermentation sélective du glucose et du lévulose qui forment le sucre inverti, et ce nouveau caractère constitue une base très sûre de différenciation de certaines espèces. On sait que la plupart des levures font fermenter sélectivement le glucose, tandis qu'un petit nombre d'espèces typiques utilisent de préférence le lévulose ; enfin quelques autres levures font fermenter les deux sucres avec la même vitesse.

Ces méthodes de travail nous ont permis de mettre en évidence dans le moût de raisin les espèces suivantes :

Kloeckera apiculata, Kloeckera africana, Kloeckera jensenii.

Torulopsis bacillaris, Torulopsis famata.

Brettanomyces vini.

Candida pulcherrima, (*Candida mycoderma*).

Rhodotorula mucilaginosa.

Saccharomyces ellipsoïdeus, Sacch. oviformis, Sacch. bayanus, Sacch. chevalieri, Sacch. fructuum, Sacch. carlsbergensis, Sacch. uvarum, Sacch. florentinus, Sacch. steineri, Sacch. heterogenicus, Sacch. acidifaciens, Sacch. elegans, Sacch. veronae.

Saccharomycodes ludwigii.

Torulaspora rosei, Torulaspora delbrueckii.

Hansenula anomala.

Pichia fermentans, Pichia membranaefaciens.

Debaryomyces hansenii.

Le chapitre III donne une description détaillée de chacune de ces espèces.

Dans le chapitre IV nous rendons compte de nos recherches dans les régions de vins rouges : Médoc, Libournais, Graves, Premières Côtes de Bordeaux, 1 070 souches isolées se répartissent en 628 sporogènes, et 442 ne donnant pas de spores. Deux espèces dominent et représentent 80 p. 100 des souches isolées : *Kloeckera apiculata* et *Saccharomyces ellipsoïdeus*. Les espèces complémentaires sont irrégulièrement réparties et restent beaucoup moins importantes ; parmi elles, *Sacch. chevalieri* et *Torulaspora rosei* sont les plus représentées. Nous avons rencontré quelques espèces rares qui n'avaient pas été trouvées dans de tels milieux, comme *Sacch. fructuum, Pichia fermentans, Torulopsis famata*. De même ont été isolées quatre souches de *Brettanomyces* à une époque où ce genre de levure n'avait pas encore été rencontré dans les vins.

Le pouvoir alcoogène varie fortement, comme il est connu, d'une espèce à l'autre, et il varie aussi dans le cadre d'une même espèce suivant les souches. Les *Kloeckera apiculata* forment de 3 à 6° d'alcool tandis que les *Sacch. ellipsoïdeus* en produisent de 8 à 17°. D'une façon générale, le pouvoir alcoogène des levures du Libournais est plus élevé que celui des levures du Médoc.

Dans le chapitre V qui traite des levures des régions de vins blancs, nous indiquons la répartition des 953 souches isolées : 672 sporogènes, 281 non sporogènes. Nous distinguons les régions de raisins non pourris, ou peu pourris, donnant des vins secs ou peu sucrés, et les régions de « pourriture noble », dans lesquelles, grâce au *Botrytis cinerea* qui attaque la pellicule et permet la concentration du suc du raisin, on obtient des vins du type liquoreux. La microflore de base de ces deux régions paraît être sensiblement la même, cependant on enregistre l'importance remarquable de *Sacch. oviformis* et de *Torulopsis bacillaris* ; cette dernière espèce semble spécifique des raisins pourris. Le fait que *Botrytis cinerea* sécrète un antibiotique antilevure n'est peut-être pas étranger à la modification de la microflore constatée dans les raisins pourris. On pourra être frappé également par le fait que *Sacch. oviformis* ne constitue que 16,8 p. 1000 des souches issues de vendanges rouges, et 79 p. 1 000 de celles provenant de moûts blancs. Apparaissent également certaines espèces non représentées dans les raisins rouges : *Sacch. heterogenicus, Sacch. acidifaciens, Sacch. elegans, Saccharomycodes ludwigii*.

Le pouvoir alcoogène des levures des régions de vins blancs est dans l'ensemble plus élevé que dans les régions de vins rouges. Les moûts blancs étant généralement plus riches en sucre que les moûts rouges, ces faits confirment l'adaptation des levures des vignobles aux milieux qu'elles font habituellement fermenter.

En étudiant la succession des espèces au cours de la fermentation, on

retrouve l'image qui en a été donnée par les auteurs d'études précédentes : les levures non sporogènes assurent le départ et la première phase de la fermentation. Ce sont *K. apiculata* pour les moûts rouges, *K. apiculata* et *T. bacillaris* pour les moûts de raisins blancs. Puis très rapidement les levures sporogènes envahissent le milieu, notamment les *Saccharomyces* et *T. rosei*, de telle façon qu'à la fin de la fermentation on ne retrouve plus aucune espèce non sporogène. A ce moment, dans les moûts riches, l'espèce dominante est *Sacch. oviformis* levure finisseuse qui se caractérise par un pouvoir alcoogène élevé.

Après avoir récapitulé dans le chapitre VI la répartition des 2 023 souches de levures fermentatives isolées, nous relatons les résultats d'essais ayant pour but d'étudier l'action de certains agents inhibiteurs sélectifs, tels que l'éthanol et l'actidione, sur la microflore isolée. L'addition d'alcool élimine *Kloeckera apiculata* et les levures de faible pouvoir fermentatif ; l'addition d'actidione, antibiotique antifongique, à condition qu'elle soit pratiquée avant tout départ de la fermentation, fait disparaître presque entièrement les *Saccharomyces*, ce qui met en valeur le nombre des *K. apiculata* et *Torulopsis bacillaris* ; l'addition simultanée d'alcool et d'actidione ne laisse que quelques levures de pouvoirs alcoogènes moyens : *Torulopsis bacillaris, Torulaspora rosei*, à côté de levures non fermentatives.

Dans ce même chapitre, nous mettons en relief le rôle particulier que jouent dans la vinification des levures telles que *T. rosei*, *T. bacillaris*, *Sacch. acidifaciens*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Brettanomyces vini*. Enfin nous comparons nos résultats avec ceux que les chercheurs italiens ont obtenus dans les régions d'Italie situées à la même latitude que la Gironde, et nous constatons qu'ils concordent assez bien, en ce qui concerne tout au moins les vendanges rouges. Comme l'a démontré CASTELLI, le climat a une influence déterminante sur la microflore de la fermentation. Mais les modifications profondes apportées par l'intervention du *Botrytis cinerea* n'avaient pas été observées par les auteurs italiens.

L'étude consacrée aux levures restant dans les vins après vieillissement et susceptibles de provoquer leur refermentation lorsqu'ils présentent encore du sucre, fait l'objet du septième chapitre. 207 souches provenant de 70 échantillons de vins blancs et rouges, ont été isolées et identifiées. Ce sont des espèces de fin de fermentation, douées de propriétés bien particulières, qui sont résistantes à l'alcool et de plus, dans les vins blancs, résistantes à l'acide sulfureux. Certaines de ces espèces sont très rarement rencontrées dans les moûts et deviennent par contre très courantes dans les vins blancs ; il en est ainsi pour *Saccharomycodes ludwigii*, *Sacch. acidifaciens*. On peut les assimiler à de véritables levures de maladie, occasionnant des troubles et des diminutions de qualité considérables.

Mais la levure le plus couramment à l'origine des refermentations des vins est *Sacch. oviformis* ; nous l'avons trouvée dans 33 échantillons sur 70, seule 16 fois, associée à une autre levure 17 fois. *Sacch. oviformis* présente donc une importance considérable en œnologie : levure finisseuse, sa présence est souhaitable au cours de la fermentation des vins qui ne doivent pas conserver de sucre (vins rouges, vins blancs secs), mais, levure de refermentation, il faudrait pouvoir l'éviter dans les vins que l'on veut conserver sucrés. La vinification de ces deux catégories de vins serait considérablement améliorée si l'on pouvait être parfaitement maître du développement de cette levure, et tout particulièrement s'il était possible de l'inhiber spécifiquement.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Agostini (O.). — *L'agricoltura italiana*. **193**, 1950.
(2) Antoniani (C.). — *Ind. agrar. Progr. vinic. agrar.*, 1947.
(3) Barnett (J. A.) et Ingram (M.). — *Journ. Applied Bact.*, **18**, 131, 1955.
(4) Barret (A.), Bidan (P.) et André (L.). — *C. R. Acad. Agric.*, **41**, 426, 1955.
(5) Beraud (P.). — *Arch. Inst. Pasteur.* Tunis, **26**, 723, 1937.
(6) Beraud (P.). — *Ann. Ferm.*, **4**, 242, 1938.
(7) Bidan (P.) et André (L.). — *X^e^ Congrès Intern. Ind. agric. alim. Madrid*, 1954.
(8) Bouthilet (R. J.), Neilson (N. E.), Mrak (E. M.) et Phaff (H.). — *Journ. of general Microb.*, **3**, n° 2, 1949.
(9) Bremond (E.) et Courtoisier (A.). — *Bull. Intern. Vin*, n° 294, 96, 1955.
(10) Cantarelli (C.). — *Boll. Soc. Biol. sperim.*, **26**, 2, 1950.
(11) Cantarelli (C.). — *Rivista viticolt. enol. Conegliano*, **6**, 82, 1953.
(12) Capriotti (A.). — *Ann. Facolta di agraria, Perugia*, **8**, 1952.
(13) Capriotti (A.). — *Atti. Accad. ital. vite vino*, **5**, 1953.
(14) Capriotti (A.) et Cantarelli (C.). — *Rivista viticolt. enol. Conegliano*, n° 6, 7, 8, 1952.
(15) Casale (L.) et Mensio (C.). — *Bull. Intern. Vin*, **91**, 131, 1935.
(16) Castelli (T.). — *Nuovi Annali dell'Agricoltura*, **19**, 1939.
(17) Castelli (T.). — *Ann. di. Microb.*, **19**, Fasc. 6, 1941.
(18) Castelli (T.). — *Ann. di Microb.*, **20**, Fasc. I, 1941.
(19) Castelli (T.). — *Ann. di Microb.*, **20**, Fasc. 4, 1942.
(20) Castelli (T.). — *La Ricerca scientifica*, **18**, 1948.
(21) Castelli (T.). — *Rivista viticolt. enol. Conegliano*, n° 8, 1948.
(22) Castelli (T.). — *Ann. Facolta di agraria*, Perugia, t. 5, 1948.
(23) Castelli (T.). — *Ann. Accad. agric.*, Torino, **49**, 91, 1948.
(24) Castelli (T.). — *Rivista viticolt. enol., Conegliano*, n° 5 et 6, 1950.
(25) Castelli (T.). — *Atti. Accad. ital. vite vino*, **2**, 1950.
(26) Castelli (T.). — *Atti. Accad. ital. vite vino*, **4**, 1952.
(27) Castelli (T.). — *Rev. Ferm. Ind. alim.*, **7**, 35, 1952.
(28) Castelli (T.). — *IX^e^ Congrès Intern. Ind. agric.*, Rome, 1952.
(29) Castelli (T.). — *VI^e^ Congrès Intern. Microb.*, Rome, 1953, *in Archiv. für Mikrob.*, **20**, 323, 1954.
(30) Castelli (T.). — *X^e^ Congrès Intern. Ind. agric.*, Madrid, 1954.
(31) Castelli (T.) et Del Giudice (E.). — *Rivista viticolt, enol.*, Conegliano, n° 10, 11, 12, 1953.

(32) Castelli (T.) et Del Giudice (E.). — *Rivista viticolt. enol.*, Conegliano, **8**, 127, 1955.
(33) Ciferri (R.) et Verona (O.). — *Mycopathologia*, **4**, 243, 1948.
(34) Cordier (J. A.). — *Ann. Brass. Dist.*, **9**, 62, 1906.
(35) Descoffre (A.). — Etude sur les levures œnogènes des Charentes. Thèse Pharmacie, Bordeaux, 1904.
(36) Diddens (H. A.) et Lodder (J.). — Die anaskosporogenen Hefen, II Halfte, Amsterdam, 1942.
(37) Fernbach (A.), Schoen (M.) et Mori (M.). — *Ann. Inst. Pasteur*, **42**, 805, 1928.
(38) Florenzano (G.). — *Ann. sperim. agrar.*, **3**, 887, 1949.
(39) Florenzano (G.). — *La Ricerca scientifica*, **20**, 1494, 1950.
(40) Florenzano (G.). — *Atti. Accad. ital. vite vino*, **3**, 236, 1951.
(41) Gallay (R.), Benvegnin (L.), Capt (E.). — *Annuaire agric. de la Suisse*, **53**, 915, 1952.
(42) Galzy (P.). — *Progrès agric. et vitic.*, **141**, 150, 1954.
(43) Galzy (P.). — *Ann. Technologie agric.*, **4**, 417, 1955.
(44) Galzy (P.) et Rioux (J. A.). — *Progrès agric. et vitic.*, **144**, 365, 1955.
(45) Gayon (U.) et Dubourg (E.). — *C. R. Acad. Sci.*, **110**, 865, 1890.
(46) Genevois (L.). — *Ind. Agric. Alim.*, **66**, 329, 1949. *Bioch. Bioph. Acta*, **4**, 179, 1950. *Rev. Ferm. Ind. Alim.*, **6**, 18, 43, 88 et 111, 1951. — *Bull. Ass. Microbiol.*, Nancy, n° 44, 1951.
(47) Glaubitz (M.). — *Atlas des organismes de fermentation.* — Dunod, Paris, 1936.
(48) Gray (W. D.). — *American Journ. of Botany*, **36**, 475, 1949.
(49) Guilliermond (A.). — Clef dichotomique pour la détermination des levures. Lib. Le François, Paris, 1928.
(50) Hjort (A.). — C. R. Lab. Carlsberg, Ser. Physiol., **25**, 259, 1954.
(51) Ingram (M. A.). — An Introduction to the Biology of Yeasts. Pitman and Sons Ltd, London, 1955.
(52) Jorgensen (A.). — Microorganisms and fermentation. Londres, p. 243, 1900.
(53) Kayser (E.). — *Revue de Vitic.*, **45**, 149, 1916.
(54) Kirsop (B. H.). — *Journ. Inst. Brewing*, **51**, 210, 1954.
(55) Krimbas (B. D.) et Davides (V. X.). — *VI*e *Congrès Intern. de la Vigne et du Vin*, Athènes, 1950.
(56) Lafon (M.) . — Contribution à l'étude de la formation des produits secondaires de la fermentation alcoolique. Thèse Sciences Phys. Bordeaux, 1955. — *Ann. Technologie agric.*, **4**, 169 et 241, 1955. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956.
(57) Lafourcade (S.). — Contribution à l'étude des activeurs et des inhibiteurs de la fermentation alcoolique des moûts de raisin. Thèse Ingénieur-Docteur, Bordeaux, 1955. *Ann. Technologie agric.*, **4**, 283, 1954, *Ind. agric. alim.*, **71**, 15, 1954.
(58) Lindegren (C. C.) et Palleroni (N. J.). — *Nature, G. B.*, **169**, 878, 1952.
(59) Lindegren (C. C.) et Pittmann. — *Journ. gen. Microb.*, G. B., **9**, 494, 1953.
(60) Lodder (J.). — Die anaskosporogenen Hefen. I Hälfte. Amsterdam, 1934.
(61) Lodder (J.) et Kreger-Van Rij (N. J. W.). — The Yeasts. North Holland publishing Company, Amsterdam, 1952.
(62) Lodder (J.) et Kreger-Van Rij (N. J. W.). — Laboratory Practice, **3**, 483, 1954, et **4**, 20 et 53, 1955.
(63) Lund (A.). — Studies on the Ecology of Yeasts. Munksgaard Copenhagen, 1954.
(64) Malan (C. E.). — *Atti. Accad. ital. vite vino*, **3**, 338, 1951.
(65) Marques Gomes (J. V.). — *Anais Inst. Vinho Porto*, **10**, 51, 1949.
(66) Marteau (G.) et Galzy (P.). — *Progrès agric. et vitic.*, **142**, 53, 1954.
(67) Martinaud (V.). — *Revue de Vitic.*, **32**, 174, 1909.

(68) MOREAU (L.) et VINET (E.). — *Ann. des ferm.*, **1**, 101, 1935-36.
(69) MORRIS (E. O.). — *Journ. Applied. Bact.*, **18**, 126, 1955.
(70) MORRIS (E. O.) et KIRSOP (B.). — *Journ. Inst. Brewing*, **59**, 486, 1953.
(71) MRAK (E. M.) et MCCLUNG (L. S.). — *Journ. of Bacteriology*, **40**, 395, 1940.
(72) MRAK (E. M.) et PHAFF (H. J.). — *Yeasts. Annual Review of Microb.*, 1948.
(73) MULLER-THURGAU (H.). — *Zentralblatt. für Bakt.*, nº 20, 1899.
(74) MUSSO (L.). — Contribution à l'étude des levures algériennes. Thèse Sciences, Paris, 1913.
(75) MUSSO (L.). — Les levures sélectionnées de vinification. Institut Pasteur d'Algérie, Alger 1932.
(76) NIEHAUS (J. G.). — *Zentralblatt. für Bakt.*, **87**, 97, 1932.
(77) NITESCU (M. A.). — Contribution à l'étude des levures roumaines. Thèse Sciences, Paris, 1915.
(78) PASTEUR (L.). — Etudes sur la bière. (Œuvres de Pasteur, t. 5), 1876.
(79) PEYNAUD (E.) et DOMERCQ (S.). — *Ann. Technologie agric.*, **4**, 265, 1953.
(80) PEYNAUD (E.) et DOMERCQ (S.). — Xe Congrès Intern. Ind. agric. alim., Madrid, 1954.
(81) PEYNAUD (E.) et DOMERCQ (S.). — *Ann. Inst. Pasteur*, **89**, 346, 1955.
(82) PEYNAUD (E.) et DOMERCQ (S.). — *C. R. Acad. agric.*, **41**, 103, 1955.
(83) PEYNAUD (E.) et DOMERCQ (S.). — *Archiv. für Mikrob.*, 1956.
(84) RANKINE (B. C.). — *Austr. Journ. Applied Science*, **5**, 298, 1954.
(85) RANKINE (B. C.). — *Austr. Brew. Wine Journ. in Bull. Intern. Vin*, nº 281, 70, 1954. *Austr. Journ. Applied Science*, **6**, 408, 1955.
(86) RENAUD (J.). — Les levures des vins du Val de Loire. Recherches morphologiques, biologiques et cytologiques. Thèse Sciences naturelles, Paris, 1941.
(87) RENAUD (J.). — Biologie du Vin. Presses Universitaires de France, Paris.
(88) ROMMIER (A.). — *C. R. Acad. Sci.*, **98**, 1594, 1884.
(89) ROSENSTHIEL (A.). — *Revue vit.*, **11**, 509, 1899.
(90) ROSSI (G. DE). — *Staz. Sperim. agrar. ital.*, **50**, 529, 1917.
(91) ROSSI (G. DE). — *Staz. Sperim. agrar. ital.*, **53**, 233, 1920.
(92) ROSSI (G. DE). — IVe Congrès Intern. Vigne et Vin, Lausanne 1935, in *Bull. intern, Vin*, **91**, 133, 1935.
(93) ROSSI (J.). — *Ann. Facolta di Agraria*, Perugia, **9**, 1953.
(94) ROTINI (O. T.). — *Ann. Facolta di Agraria*, Perugia, **13**, 1952.
(95) ROY-CHEVRIER. — *Revue Vitic.*, **11**, 85, 1899.
(96) SALLER (W.). — *Wein und Rebe*, nº 27, 540, et nº 28, 562, 1954.
(97) SCARDOVI (V.). — IXe Congrès Intern. Ind. agr., Rome, 1952.
(98) SCHANDERL (H.) et DRACZYNSKI (M.). — *Wein und Rebe*, nº 20, 462, 1952.
(99) SCHEFFER (W. R.) et MRAK (E. M.). — *Mycopathologia mycologia applicata*, **5**, 236, 1951.
(100) SCHULLE (H.). — *Archiv. für. Mikrobiol.*, **18**, 133, 1953.
(101) SCHULLE (H.). — *Archiv. für. Mikrobiol.*, **18**, 342, 1953.
(102) SCHULLE (H.). — *Wein und Rebe*, **36**, 736, 1954.
(103) SKINNER (C. E.) et BOUTHILET (R.). — *Journ. Bact.*, **53**, 37, 1947.
(104) SOOS (I.) et ASVANY (A.). — *Ann. Inst. Rech. Ampelogr*, Budapest, **10**, 255, 1950.
(105) STEINBERG (B.). — *Trav. Chim. Alim. Hygien.*, **43**, 219, 1952.
(106) STEINBERG (B.). — Les levures actives des vins flétris du Domaine de Diolly, Thèse Sciences, Genève, 1953.
(107) STELLING-DEKKER (N. M.). — Die Sporogenen Hefen., Amsterdam, 1931.
(108) TABACHNIK (J.) et JOSLYN (M. A.). — *Journ. Bact.*, **65**, I, 1953 ; *Plant. Physiology*, **28**, 681, 1953.
(109) TARANTOLA (C.). — *Boll. Soc. Intern. Microbiologia*, **5**, 345, 1933.
(110) TARANTOLA (C.). — *Ann. Accad. Agric.* Torino, **80**, 1945-1946.
(111) VAN UDEN et ASSIS-LOPEZ. — *Archiv. für Mikrob.*, **19**, 262, 1953.
(112) VENTRE (J.). — *Revue Vitic.*, **80**, 181, 1934.

(113) VERONA (O.). — *Ann. Facolta di Agraria*, Pisa, **8**, 27, 1947.
(114) VERONA (O.). — *Atti. Accad. Georgofili*, 1947.
(115) VERONA (O.). — *Ann. Facolta di Agraria*, Pisa, **12**, 123, 1951.
(116) VERONA (O.). — *Atti. Accad. ital. vite vino*, **3**, 203, 1951.
(117) VERONA (O.). — *Ann. Inst. Pasteur*, **82**, 245, 1952.
(118) VERONA (O.) et FLORENZANO (G.). — *L'Agricoltura italiana*, **47**, 113, 1947.
(119) VERONA (O.) et FLORENZANO (G.). — *Rendiconti dell'Accad. Lincei*, **3**, 383, 1947.
(120) VERONA (O.) et FLORENZANO (G.). — *Ricerca Scient. e ricostruzione*, **17**, n° 9, 1947.
(121) VERONA (O.) et FLORENZANO (G.). — *Ann. Facolta di Agraria*, Pisa, **8**, 1947.
(122) WALT (J. P. VAN DER). — On the Yeast Candida pulcherrima and its pigment. Thèse, Delft, 1952.
(123) WICKERHAM (L. J.). — *Journ. Bact.*, **46**, 501, 1943.
(124) WICKERHAM (L. J.). — Taxonomy of Yeasts, *Technical Bull.*, n° 1029, U. S. Dept, of Agric, Washington, 1951.
(125) WICKERHAM (L. J.) et BURTON (K. A.). — *Journ. Bact.*, **56**, 363, 1948.
(126) YOKOTSUKA (I.). — Studies on Japanese Wine Yeasts, Research Inst. of Fermentation, Yamanashi, 1954.
(127) YOKOTSUKA (I.) et GOTO (S.). — *Journ. Agric. Chem. Soc. Jap.*, **29**, 39 et 123, 1955.
(128) ZIMMERMANN (J.). — in *Revue Vitic.*, **90**, 472, 1939.

APPLICATION DU TITRAGE POTENTIOMÉTRIQUE A L'ÉTUDE DU VIN

PAR

J. RIBÉREAU-GAYON et J. GARDRAT
Station Agronomique et Œnologique de Bordeaux

Expériences de Geloso (1931).

Les seules courbes qui aient été publiées de titrage potentiométrique relatives au vin, donnant les variations de son potentiel d'oxydo-réduction en fonction d'additions d'un oxydant ou d'un réducteur, ont été données en 1931 par J. GELOSO (1), collaborateur de R. WURMSER à l'Institut de Biologie physico-chimique. Le titre même du travail *Relation entre le vieillissement des vins et leur potentiel d'oxydo-réduction* marque l'intérêt à la fois théorique et technique de cette étude.

GELOSO constate d'abord que le potentiel d'une lame de platine plongeant dans un vin, ou potentiel d'oxydo-réduction de ce vin, diminue lentement jusqu'à une valeur limite, ou potentiel limite, lorsque le vin est à l'abri de l'oxygène, et qu'il s'élève rapidement lorsque le vin est aéré. On utilise donc un vin réduit, amené à son potentiel limite soit par repos prolongé à l'abri de l'air, soit par addition d'un peu d'hydrosulfite ou de citrate de titane. On verse à intervalles de temps égaux des quantités égales d'oxydant (ferricyanure de potassium ou bleu de méthylène), et on suit électrométriquement cette opération.

Sur un vin rouge (Châteauneuf du Pape 1925) amené à pH 9, GELOSO a obtenu la courbe de forme classique ci-contre (fig. 1, courbe de gauche). Sur 20 ml d'un vin, il versait toutes les minutes 2 gouttes d'une solution de ferricyanure à 10 g par litre. Il retrouvait la même courbe en titrant en sens inverse, par l'hydrosulfite ou le citrate de titane. Il effectuait les mêmes titrages en présence de bleu de méthylène qui, avec son dérivé réduit incolore, constitue un système oxydo-réducteur typique ayant un potentiel normal bien défini, se traduisant sur la courbe par un palier caractérisé (fig. 1, courbe de droite).

Il résulte de ces courbes de titrage que ce vin renferme un système oxydo-réducteur dont le potentiel normal est — 0,115 volts à pH 9. En

outre, on calcule d'après la quantité de ferricyanure qui correspond à la totalité de la courbe, que le vin contient le système titré en quantité correspondant à $3 \cdot 10^{-4}$ molécule d'hydrogène par litre. Enfin ce système est directement oxydable par l'oxygène de l'air ; en effet si on remplace l'addition de ferricyanure par un courant d'oxygène, le potentiel suit la même courbe, ce qui signifie que ce système cède son hydrogène à l'oxy-

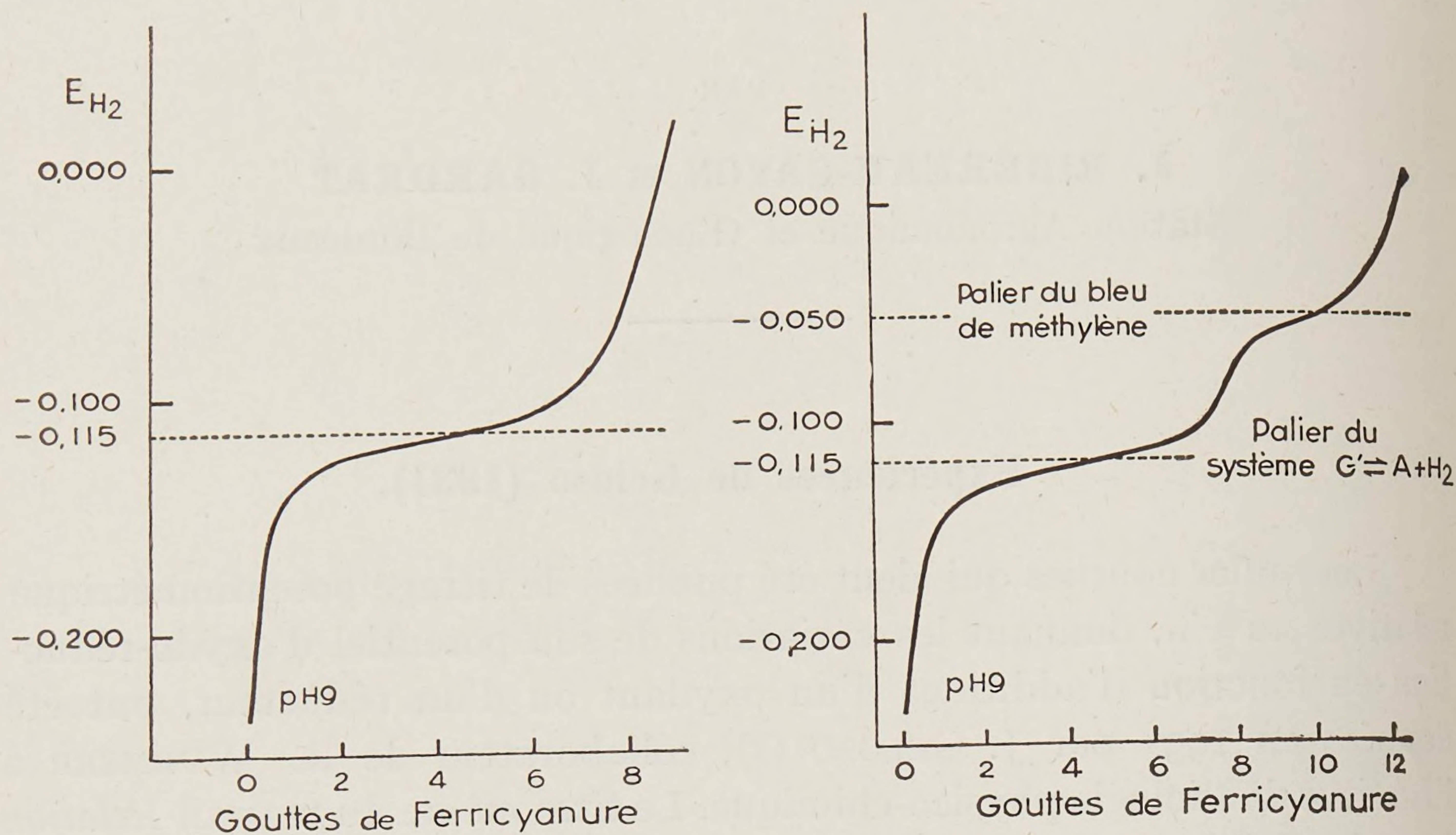


Fig. 1. — Titrage d'un vin à pH 9 par le ferricyanure (Geloso).

gène de l'air, comme à tout accepteur d'hydrogène. Comme ce système agit rapidement, il constitue un catalyseur des échanges d'oxygène et d'hydrogène et en particulier un catalyseur de l'oxydation du vin.

Geloso a effectué sur le même vin un second titrage en opérant lentement, en laissant le potentiel remonter après l'addition de ferricyanure et en faisant une nouvelle addition de ferricyanure au bout de plusieurs jours. Il constate ainsi l'existence d'un second système, réagissant lentement, plus réducteur que le premier, dont le potentiel normal est — 0,160 *v* à pH 9 et dont la quantité est de l'ordre de $1{,}5 \cdot 10^{-2}$ molécules d'hydrogène par litre. Ce système est entièrement réduit dans le vin maintenu à l'abri de l'air puisque le potentiel limite de ce vin est — 0,230 *v*, et ce serait lui qui impose au vin maintenu à l'abri de l'air ce potentiel limite. Il est capable d'opérer à froid la réduction massive de tout système dont le potentiel normal est supérieur à — 0,160 *v*, en particulier la réduction du premier système.

Interprétations de Geloso.

Tels sont les faits décrits par Geloso. Cet auteur a essayé de préciser la nature de ces systèmes. Il venait de montrer, en collaboration avec

WURMSER (2), qu'une solution de glucides abandonnée à l'abri de l'air donne spontanément naissance à des corps réducteurs qui constituent des systèmes équilibrés d'oxydo-réduction. Or les courbes de titrage potentiométriques obtenues à partir du vin sont tout à fait semblables à celles obtenues à partir de ces solutions. Le titrage offre les mêmes caractéristiques. GELOSO pouvait donc conclure que le vin doit renfermer des dérivés d'évolution des glucides, d'ailleurs non identifiés à cette époque. Des études ultérieures ont reconnu la présence dans les solutions de glucides évoluées de corps à fonction diénol, la réductone

$$CHOH = COH - CHO$$

et des dérivés de la réductone. La réductone donne, par oxydation, la déhydroréductone CHO — CO — CHO.

A partir des données expérimentales et des hypothèses qui précèdent, l'auteur a essayé d'interpréter le vieillissement naturel du vin et de préciser les conditions d'un vieillissement accéléré. Ces substances oxydo-réductrices sont certainement en relation avec des propriétés organoleptiques, soit directement, soit en imposant un potentiel qui détermine l'état d'autres substances. Elles règlent l'action de l'oxygène libre sur le vieillissement du vin et l'affinement du bouquet. Pour réaliser les meilleures conditions du vieillissement, il conviendrait d'abord de permettre à ces substances de se développer à l'abri de l'air, puis de laisser pénétrer l'air assez lentement pour oxyder faiblement le système lent, tout en maintenant réduit le système rapide. Suivant que l'oxygène est admis dès le début de la conservation du vin ou après la formation de ces corps, la composition chimique du milieu doit être tout à fait différente.

Nous n'analyserons pas davantage cette partie du travail, car elle ne nous paraît pas pouvoir être conservée, du moins dans ses détails. Mais GELOSO, qui n'était pas œnologue, a eu le mérite de montrer qu'une étude approfondie du chimisme des vins peut être envisagée par de tels procédés, qu'ils doivent permettre de prévoir la possibilité ou l'impossibilité de certaines combinaisons suivant les conditions expérimentales, et que des relations sont certaines entre les faits techniques et les phénomènes d'oxydo-réduction dont les vins sont le siège.

En terminant son étude GELOSO pense qu'il y a lieu de la généraliser : chercher les constituants du vin en équilibre d'oxydo-réduction, déterminer les conditions de leur formation, faire varier leur degré d'oxydation et examiner les conséquences sur les caractères et le goût du vin. Là où quelque chose s'expliquera par les phénomènes d'oxydo-réduction, nous pourrons avoir une action.

Depuis 1931, et surtout dans les années récentes, les conclusions de

Geloso ont été très souvent citées. Mais on peut s'étonner de ce que ces expériences n'aient pas été poursuivies et même n'aient pas été refaites. Nous dirons dans quel esprit nous avons repris l'étude de cette question.

Recherches de Ribéreau-Gayon (1928-1933).

Nous ne pouvons analyser en détail les nombreux travaux publiés sur les phénomènes d'oxydo-réduction en œnologie (3). Ceux de J. Ribéreau-Gayon (4) ont été poursuivis à la même époque que ceux de Géloso, selon des voies et des techniques très différentes, peut-être d'ailleurs plus en apparence qu'en réalité, car cet auteur effectuait sur des vins des titrages par l'hydrosulfite, le terme de la réaction étant indiqué par le virage d'un colorant d'oxydo-réduction, c'est-à-dire par une variation de potentiel, et ses conclusions complètent celles de Geloso en établissant un certain nombre de faits étroitement liés au fonctionnement des systèmes oxydo-réducteurs du vin.

Tout d'abord les traces de cations lourds que tous les vins renferment sont des catalyseurs très actifs de la fixation par les constituants du vin de l'oxygène dissous ; le cuivre est beaucoup plus actif que le fer, les deux cations associés beaucoup plus encore que le cuivre seul.

D'autre part, lorsqu'un vin au repos, à l'abri de l'air depuis longtemps, est agité au contact de l'air, il dissout de l'oxygène en quantité plus ou moins grande suivant les conditions de l'aération (au maximum 6 ml à 20°). Très rapidement une fraction de cet oxygène est fixée sur certains constituants du vin, représentés par R, et forme des corps oxydants, que l'on peut représenter par RO_2, sans d'ailleurs rien préjuger de la nature de ces corps, car l'oxydation de R peut être une perte d'hydrogène ou d'électrons aussi bien qu'une fixation d'oxygène. On détermine dans un vin le taux de RO_2 par titrage avec l'hydrosulfite en présence de carmin d'indigo comme indicateur en déduisant la teneur en oxygène dissous. Lorsque le vin est remis à l'abri de l'air, ces corps RO_2 disparaissent en même temps que l'oxygène dissous.

En somme un vin au repos à l'abri de l'air renferme R ; lorsqu'il vient d'être aéré il renferme R et O_2 ; au bout d'un certain temps il renferme R, O_2 et RO_2, réalisant l'équilibre :

$$R + O_2 \rightleftarrows RO_2.$$

Or le corps ou les corps RO_2 sont beaucoup plus oxydants que l'oxygène moléculaire. Ils oxydent et recolorent le carmin d'indigo réduit avec beaucoup plus de rapidité que l'oxygène libre. La différence est encore plus sensible avec le bleu de méthylène qui est moins oxydable que le carmin d'indigo, son potentiel normal à pH 7 étant de 0,01 *v* au lieu

de — 0,12 *v*. Souvent le bleu de méthylène décoloré n'est pas recoloré par les vins réduits contenant seulement O_2, tandis qu'au contraire il est instantanément recoloré par les vins contenant RO_2.

Ce mécanisme joue un rôle essentiel dans l'oxydation du vin, dans la fixation d'oxygène par les constituants du vin. Le vin renferme des substances R qui sont autoxydables, c'est-à-dire oxydables directement par l'oxygène de l'air en donnant des corps RO_2, véritables « oxydants intermédiaires », qui oxydent secondairement d'autres substances, lesquelles ne seraient pas oxydées directement par l'oxygène moléculaire dissous, par lui-même oxydant très faible.

Si on désigne par A une molécule oxydable, celle d'un polyphénol par exemple, on peut écrire la réaction suivante non reversible (dans laquelle AO_2 n'est pas un oxydant).

$$RO_2 + A \rightarrow AO_2 + R.$$

Ce sont ces réactions qui apportent au vin des modifications définitives, persistant après la disparition de l'oxygène dissous. La vitesse de la fixation de l'oxygène par un vin est commandée par les vitesses de ces réactions et non par les vitesses des premières qui sont rapides.

Quant à la nature des substances RO_2, il est aisé de constater que les cations ferrique et cuivrique, y compris les complexes ferriques qui sont présents dans tous les vins aérés, sont réduits par l'hydrosulfite et constituent une fraction des substances RO_2 trouvées au cours de l'oxydation. La corrélation est certaine entre leur pouvoir catalytique et leur propriété d'osciller d'une forme réduite à une forme oxydée et de constituer des systèmes oxydo-réducteurs.

Mais il est aisé aussi de constater que les composés ferriques et cuivriques ne constituent pas la totalité des oxydants intermédiaires RO_2. On peut d'abord le montrer quantitativement. D'autre part il est intéressant de rappeler une expérience significative.

Un vin blanc privé d'oxygène libre dissous par un repos suffisant à l'abri de l'air, réduit plus ou moins rapidement le bleu de méthylène et les colorants de potentiels normaux voisins, ajoutés en faible proportion. Récemment saturé d'oxygène, ce vin se comporte de la même manière. Il se comporte encore à peu près de la même manière s'il est additionné d'un peu de fer trivalent ou de cuivre bivalent. Au contraire, s'il est saturé depuis quelques minutes et plus encore depuis quelques heures, il ne réduit plus le bleu de méthylène.

Ainsi dans le vin aéré, il se forme des substances autres que les ions Fe^{+++} et Cu^{++} plus oxydantes que l'oxygène moléculaire. L'élévation du potentiel d'oxydo-réduction du vin est parallèle à l'apparition des corps RO_2 titrés par l'hydrosulfite, ainsi qu'à l'abaissement du taux et de la vitesse de réduction des colorants d'oxydo-réduction.

Conclusions de Ribéreau-Gayon.

Voici d'ailleurs comment l'auteur exprimait ces notions, à cette époque toutes nouvelles pour l'œnologie, mais rentrant dans le cadre de notions générales.

« La présence de corps oxydants intermédiaires que nous avons rencontrés (dans les vins) sans idée préconçue, satisfait pleinement aux faits connus, groupés sous le nom d'autoxydation et d'activation de l'oxygène. L'oxygène moléculaire se fixe directement sur certaines substances qui, pour cette raison, sont appelées autoxydables, en donnant des « peroxydes instables »..., qui oxydent secondairement d'autres substances dites « accepteurs d'oxygène », qui ne seraient pas oxydées par l'oxygène moléculaire, par lui-même oxydant très faible. Quels sont ces corps oxydants que nous venons de déceler dans le vin et que nous avons même le moyen de doser. Ils nous apparaissent comme des corps intermédiaires de l'oxydation du vin par l'air atmosphérique, se formant dès que le vin contient de l'oxygène... et disparaissant après la combinaison de l'oxygène dissous, en oxydant les éléments du vin. Ces substances ont un pouvoir oxydant plus grand que celui de l'oxygène moléculaire... D'autres substances, qui ne seraient pas oxydées par l'oxygène moléculaire, s'oxydent secondairement grâce aux corps oxydants formés dans la première réaction. Parmi les oxydants intermédiaires, signalons l'ion ferrique et l'ion cuivrique... Mais les dosages des ions ferriques et cuivriques dans les vins montrent qu'ils n'interviennent que pour une faible part dans la teneur en oxydants intermédiaires formés au cours de l'oxydation... »

Par ailleurs la mesure du potentiel d'oxydo-réduction du vin a permis à Ribéreau-Gayon d'interpréter les phénomènes intéressant l'oxydation et la réduction du fer et du cuivre, avec les précipitations qui en sont la conséquence, et d'autre part de démontrer définitivement que le fer trivalent du vin est engagé dans des complexes ; il existe en effet un écart important entre le potentiel normal du système $Fe^{++} \leftrightarrows Fe^{+++}$ (soit 0,71 *v*) et le potentiel maximum du vin aéré (inférieur à 0,50 *v*) dans lequel les concentrations en Fe^{III} et Fe^{II} total sont du même ordre. Enfin cet auteur a effectué des titrages par l'iode de vins plus ou moins réduits ou plus ou moins oxygénés.

L'intérêt théorique de ces diverses notions est certain. Elles complètent celles de Geloso ; les substances $R \rightleftarrows RO_2$ sont les systèmes oxydo-réducteurs de Geloso.

Leur intérêt pratique n'est pas moins grand si on considère le rôle de l'oxygène dans la plupart des préoccupations de l'œnologie, qu'il s'agisse du vieillissement des différents types de vin ou des précipitations dont ils sont le siège. On est amené à comparer l'oxydation ménagée du vin qui s'accomplit à un potentiel bas, à l'oxydation violente qui s'accomplit à un potentiel élevé.

Systèmes oxydo-réducteurs du vin.

La relation est évidente entre les systèmes $R + O_2 \rightleftarrows RO_2$ décelés dans le vin par Ribéreau-Gayon en 1931, jouant le rôle « d'oxydants intermédiaires » et de catalyseurs d'oxydation et les systèmes oxydo-réducteurs décelés par Geloso dans ce même liquide, à la même époque, par une voie entièrement différente. Geloso d'ailleurs attribue explicitement aux systèmes qu'il décrit un rôle catalytique dans l'oxydation du vin. Mais le problème de la nature de ces substances demeure encore aujourd'hui sans solution certaine.

Les conclusions de Geloso sur la nature de ces systèmes ont été fréquemment répétées, mais jamais confirmées, ni d'ailleurs infirmées par des faits. Les travaux de Ribéreau-Gayon, à part le rôle démontré du fer et du cuivre, n'apportent pas d'autres précisions sur la nature de ces systèmes. Tchogovadzé (6), qui confirme la théorie des « oxydants intermédiaires », attribue cette fonction à des aglucones polyphénoliques, car le vin privé d'aglucones n'absorbe pas d'oxygène même en présence de fer.

L. Genevois (7) a pensé qu'il peut intervenir des dérivés de l'acide tartrique, soit l'acide dihydroxymaléique (COOH — COH = COH — COOH), présentant, comme la réductone, une fonction diénol et donnant par oxydation l'acide dioxytartrique (COOH — CO — CO — COOH) à fonction dicétone.

Peut-être aussi interviendrait l'acide ascorbique également à fonction diénol.

Récemment J. Baraud (8) appliquant méthodiquement dans des conditions bien précisées la réaction de la tartrazine, coloration jaune donnée par la *p*-sulphophénylhydrazine avec les corps à fonction dicétone, a pu démontrer que le vin ne renferme pas d'acide ascorbique, ni d'acide dihydroxymaléique et ne peut pas en renfermer car si on ajoute ces corps au vin, ils sont rapidement détruits. Par contre Baraud a pu établir que le vin renferme un dérivé inconnu de dégradation des glucides donnant la réaction de la tartrazine et qui apparaît soit par fermentation, soit par chauffage du glucose en milieu alcalin. On s'orienterait donc vers une confirmation de l'hypothèse de Geloso.

En définitive, il est bien clair que l'expérimentation n'est pas suffisante pour permettre aujourd'hui une synthèse de ces différents faits en une théorie cohérente comme certains auteurs ont essayé de le faire.

Objet de notre étude.

L'analyse qui précède des travaux antérieurs, bien qu'incomplète, suffit à montrer l'intérêt de l'étude des phénomènes d'oxydo-réduction en œnologie.

Après tout, comme l'exprime CHARLOT au début du traité d' « Analyse quantitative minérale », les réactions chimiques qui prennent naissance dans les solutions — c'est-à-dire précisément celles qui intéressent l'œnologie — peuvent être ramenées à trois types fondamentaux :

1° Réactions d'oxydo-réduction dans lesquelles il y a échange d'électrons.

2° Réactions acido-basiques dans lesquelles il y a échange d'ions H.

3° Réactions mettant en jeu des complexes, dans lesquelles il y a échange d'ions ou de molécules.

Les oxydo-réductions occupent donc nécessairement une place importante dans les transformations des vins.

Nous avons déjà remarqué qu'aucun des nombreux travaux publiés sur les phénomènes d'oxydo-réduction dans les vins, n'ont songé à refaire et à généraliser les expériences de GELOSO, à appliquer au vin les techniques de titrage potentiométrique soit dans les conditions même des expériences précédentes, soit dans d'autres conditions. Tel a été précisément notre but. Nous avons commencé par expérimenter à un pH voisin de celui du vin, pH 3 environ, alors que GELOSO expérimentait à pH 9, et les circonstances ne nous ont pas permis de refaire à pH 9 les mêmes expériences. Il faut bien constater que l'établissement de telles courbes de titrage demande un temps considérable.

Les titrages de GELOSO étaient effectués dans le vin amené à pH 9, c'est-à-dire à un pH très éloigné de celui du vin, en milieu alcalin, dans des conditions où le vin se modifie profondément et rapidement. Comme l'a fait remarquer RIBÉREAU-GAYON, les conclusions de ces mesures ne sont donc pas nécessairement applicables au vin, d'autant plus que c'est précisément en milieu alcalin que l'évolution des solutions de glucides est la plus sensible, d'autant plus aussi que le vin achevé renferme en général très peu de glucides. D'autre part, les mesures étaient effectuées par la méthode d'opposition en utilisant comme appareil de zéro un électromètre capillaire et il est difficile dans le cas du vin d'empêcher la polarisation des électrodes lors des tâtonnements. Enfin, les expériences de GELOSO ont été faites sur un seul vin.

L'objet de ce travail est donc de réduire et d'oxyder à l'aide de solutions titrées et à l'abri de l'oxygène, certains constituants du vin, ou du vin entier, et de suivre les variations du potentiel d'oxydo-réduction, ces opérations étant effectuées le plus possible au pH normal du vin (de l'ordre de 3) et dans la zone habituelle de son potentiel (o à 500 *v*), conditions pour lesquelles on a le plus de chances de saisir les systèmes oxydo-réducteurs du vin, et d'une façon générale ses constituants oxydables ou réductibles, tels qu'ils sont, et tels qu'ils sont susceptibles d'intervenir effectivement. Nous avons donc commencé par rechercher une bonne technique de titrage répondant à ses conditions.

Souvent les titrages ont été effectués en présence de bleu de méthylène, qui constitue avec sa forme réduite incolore un système oxydo-réducteur caractérisé, une « substance électroactive » dans la classification de WURMSER, c'est-à-dire une substance capable d'échanger rapidement des électrons avec la lame de platine.

Par contre, les « substances faiblement électroactives » comme l'acide ascorbique, ne réagissent pas sur l'électrode de platine, ou faiblement, et par conséquent ne donnent pas lieu à un équilibre et à un potentiel défini. Mais elles deviennent électroactives lorsqu'elles se trouvent dans la solution en présence de substances électroactives, comme le bleu de méthylène, la riboflavine ou vitamine B2, qui catalysent la transformation redox du premier système et le rendent réversible ; la substance prend alors un potentiel normal défini décelé par l'existence d'un palier sur la courbe de titrage. D'une façon générale les diénols, dérivés des glucides, constituent des systèmes réversibles avec les indicateurs d'oxydo-réduction tels que le bleu de méthylène.

En somme, les colorants d'oxydo-réduction permettent d'étudier les substances faiblement électroactives, de déterminer pour elles des potentiels normaux, et ainsi de les classer. On comprend donc tout l'intérêt que peut avoir cette technique consistant à associer le bleu de méthylène aux autres constituants du milieu à étudier.

L. GENEVOIS avait déjà en 1939 mis au point et appliqué une technique analogue. Il effectuait des titrages par l'hydrosulfite, l'iode, le dichlorophénolindophénol ou le bleu de méthylène, en bloquant certaines substances ou groupes de substances par le formol, le cyanure de potassium ou l'hydroxylamine. En particulier dans le cas du vin il déterminait un « pouvoir réducteur total » très analogue à celui qui peut être déterminé par la considération de nos courbes de titrage. Il est bien certain que si les événements de 1939 n'avaient pas interrompu ces intéressantes expériences, l'application méthodique de ces techniques aurait conduit à des résultats importants pour l'étude du vin.

Technique des titrages.

Nous décrirons d'abord la méthode ; nous la discuterons ensuite. Dans un bécher de forme haute, sans bec, de 250 ml, on introduit 100 ml du liquide à étudier (fig. 2).

Après passage pendant trente minutes d'un courant de CO_2 (trois bulles par seconde), l'agitateur magnétique étant réglé à une vitesse moyenne, on réduit par une solution décinormale de chlorure de titane, à raison d'une goutte toutes les trente secondes. On note les potentiels juste avant chaque affusion du réducteur. On continue d'ajouter du réducteur jusqu'à ce qu'une nouvelle addition ne diminue plus le potentiel.

On laisse alors se dégager le courant de CO_3 pendant encore trente minutes, l'agitateur magnétique étant toujours réglé sur le même plot ; on note à nouveau le potentiel.

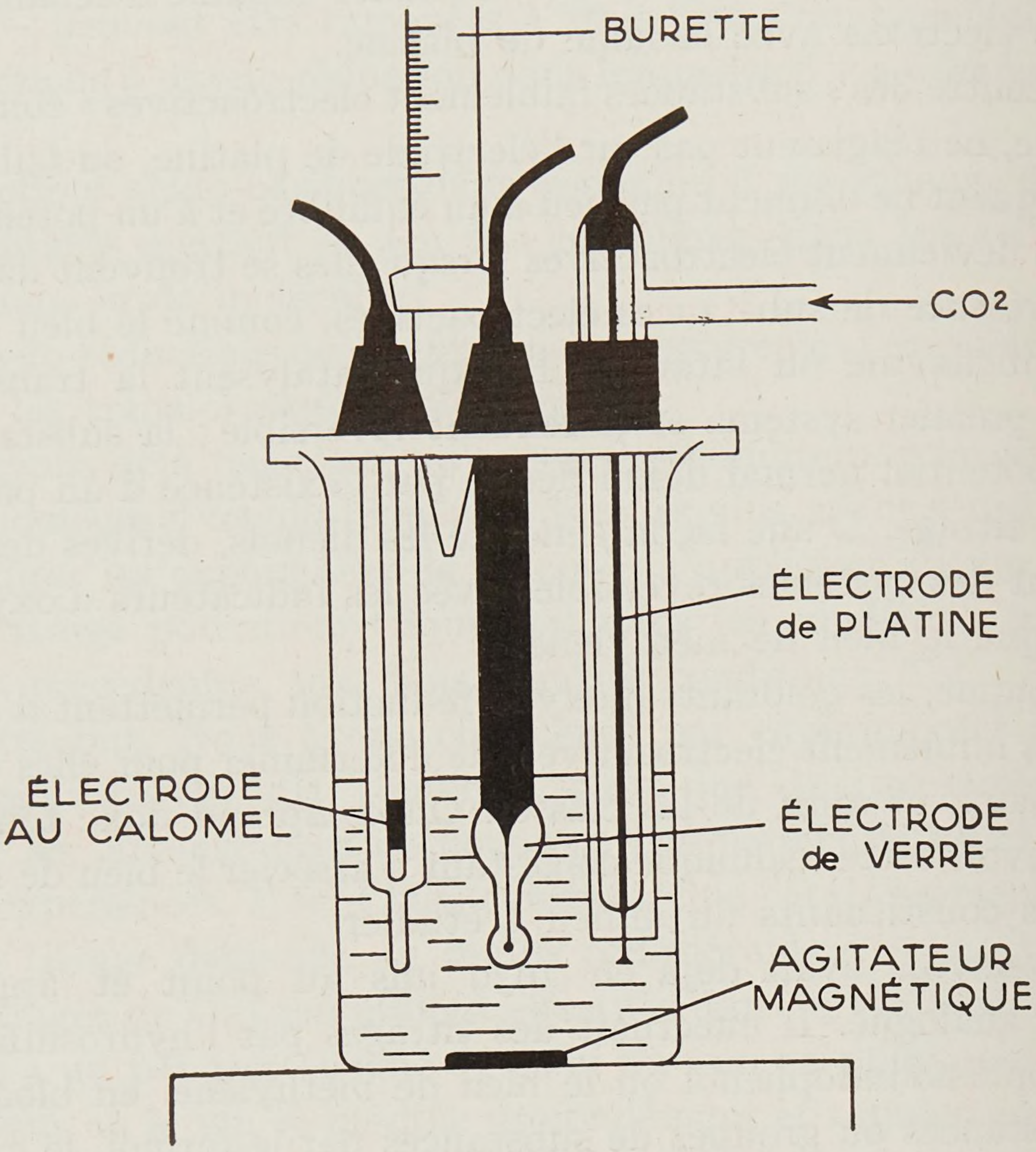


FIG. 2. — Dispositif de titrage.

Dans un deuxième temps, on place dans un bécher identique au premier 100 ml du même liquide. On introduit une quantité de $TiCl_3$ N/10, calculée d'après les résultats de la première expérience, telle qu'elle amène le potentiel aux environs de zéro. On fait dégager le CO_2 pendant trente minutes et on agite toujours de la même manière. On oxyde alors, à raison d'une goutte toutes les trente secondes, par une solution de 2,6 dichlorophénolindophénol N/100. On note le potentiel avant chaque affusion. Quand une nouvelle addition d'oxydant ne fait plus augmenter le potentiel, on cesse l'expérience ; toutefois, on laisse le CO_2 se dégager, l'agitateur magnétique fonctionnant toujours, pendant trente minutes, puis on note une dernière fois le potentiel.

Dans un troisième temps, on effectue une opération analogue en tous points à la seconde, mais en remplaçant le dichlorophénol par l'iode N/10.

Les potentiels ont été mesurés à l'aide du potentiomètre QUÉRÉ. Ils seront toujours exprimés en volts par rapport à l'électrode normale à hydrogène. Le montage comporte à côté de l'électrode de platine et

de l'électrode au calomel une électrode de verre qui permet à tous moments, à l'aide du même potentiomètre, de déterminer le pH.

On dresse donc, avec un très grand nombre de points, pour chaque liquide à étudier, trois courbes, l'une en réduction, deux en oxydation, comportant en abscisses les additions de réducteur ou d'oxydant et en ordonnées les potentiels. Les quantités de réducteur ou d'oxydant sont exprimées en nombre de gouttes de la solution, toujours versées avec la même burette. En moyenne la solution de dichlorophénolindophénol N/100 donnait vingt gouttes au millilitre, celle d'iode N/10 vingt-cinq, celle de $TiCl_3$ N/10 vingt-trois.

Les liqueurs titrées sont préparées de la manière suivante :

Iode N/10. On prépare cette liqueur suivant le procédé classique ; à une solution concentrée d'iodure de potassium on ajoute 12,7 g d'iode et après dissolution on complète au litre.

Trichlorure de titane N/10. A 1 ml de la solution commerciale à 15 p. 100, approximativement normale en titane, on ajoute 9 ml d'acide chlorhydrique normal. On conserve sous gaz carbonique.

Dichlorophénolindophénol N/100. On pèse 100 mg du produit, les entraîne dans un bécher avec 40 ml d'eau distillée bouillie ; on porte au bain-marie à 70°, agite pendant le refroidissement ; on transvase alors dans une fiole jaugée de 50 ml, on rince le bécher et complète avec les eaux de rinçage à 50 ml. On centrifuge et utilise le liquide surnageant.

Bleu de méthylène à 4,7 g par litre, soit M/40.

Discussion de la méthode.

On va considérer successivement l'oxydant, le réducteur, le gaz utilisé pour chasser l'air du récipient de dosage et le mode général d'étude.

Pour l'oxydation le choix s'est porté sur deux composés différents : l'iode et le dichlorophénolindophénol. On a essayé d'autres oxydants, l'eau oxygénée et le permanganate de potassium, mais le second est un oxydant trop brutal et le premier, moins stable que l'iode, n'a pas présenté d'avantage particulier.

Pour la réduction, on utilise du trichlorure de titane. On a essayé la réduction par chauffage du vin à 80° en vue d'éviter d'utiliser un réactif chimique et ainsi de se rapprocher des conditions naturelles de réduction de ce liquide ; mais nous n'avons pas de cette manière obtenu de potentiels assez bas et il était encore nécessaire d'ajouter presque autant de $TiCl_3$ que sans chauffage préalable.

On s'est également adressé à l'hydrosulfite de sodium ou dithionite mais ce réducteur énergique n'est pas assez stable en solution, même en présence d'hydroquinone ou de cystéine ; on note au cours des essais, qui durent parfois deux heures et davantage, l'apparition d'un trouble

dû sans doute, du moins en partie, au schéma suivant passant par l'acide thiosulfurique :

$$2S_2O_4H_2 + H_2O \rightarrow 2SO_3H_2 + S_2O_3H_2.$$
$$S_2O_3H_2 \rightarrow SO_3H_2 + S.$$

En outre, un excès de dithionite donne, lors de l'oxydation, des courbes d'apparence arbitraire, liées à des corps intermédiaires des réactions ci-dessus.

Pour ces diverses raisons, on a utilisé le trichlorure de titane qui, bien que moins énergique que l'hydrosulfite, nous a permis d'obtenir des potentiels largement assez bas, eu égard aux potentiels normalement atteints par les vins et d'englober très largement les zones de potentiel intéressantes.

D'autre part, un potentiel n'a de valeur que s'il est dû au liquide lui-même, sans être soumis à l'effet de l'hydrogène ou de l'oxygène dissous. Si l'on n'opérait pas en milieu acide, il serait nécessaire d'utiliser l'azote, car le gaz carbonique agirait sur le pH et donc sur le potentiel. Mais pour se rapprocher le plus possible des conditions naturelles, on opère aux environs de pH 3, on peut donc utiliser le gaz carbonique. Nous l'utilisons tel qu'il est fourni par l'industrie, après avoir vérifié qu'un passage prolongé dans une solution réduite, à potentiel bas, ne modifie pas sensiblement ce potentiel au bout de deux ou trois heures, délai maximum d'une expérience.

On a dû enfin fixer le mode général des essais. Les milieux et les vins que nous essayons se présentent à des potentiels divers selon les traitements antérieurs et généralement plus près du maximum que du minimum. On pouvait commencer soit par réduire, soit par oxyder. On a choisi de réduire par $TiCl_3$, jusqu'au potentiel minimum possible, d'abord et, par conséquent, d'obtenir en oxydation les courbes complètes sur toute l'échelle des potentiels. Cette manière d'opérer a, en outre, l'avantage de réduire le nombre des essais puisque nous utilisons un seul réducteur et deux oxydants et de dresser les deux courbes d'oxydation à partir du vin réduit, comme il l'est naturellement au cours de la conservation.

Ce mode opératoire permet de commencer l'oxydation du milieu additionné d'une quantité bien déterminée, et juste suffisante, de $TiCl_3$ pour avoir un potentiel convenable ; on évite ainsi l'excès de $TiCl_3$ qui, parce qu'on doit l'utiliser en milieu chlorhydrique assez concentré, aux environs de la normalité, acidifie par trop le milieu, alors que les meilleurs résultats sont obtenus entre pH2 et pH4.

Dans le même but de ne pas trop ajouter de solution chlorhydrique de titane, on a été amené à utiliser parfois non 100 ml de vin mais, surtout pour les vins rouges, une quantité moindre, 20 ml en général,

et à ramener à 100 ml avec une solution d'acide tartrique à 5 g par litre, amenée par la soude aux environs de pH3.

Un avantage d'utiliser des solutions synthétiques additionnées de vin est que, lors des essais portant sur certaines substances faiblement électroactives, comme l'acide ascorbique, donc ne réagissant pas ou faiblement sur l'électrode de platine, la présence, par l'addition de vin, de substances électroactives suffit parfois pour catalyser la transformation redox de ces substances et la rendre reversible, donc lui conférer un potentiel normal défini.

Dans le cas où l'on utilise des vins sulfités, surtout les vins blancs sucrés, il est nécessaire de bloquer SO_2 par une petite quantité de formol non polymérisé ; sans cette précaution SO_2 a une nette action perturbatrice sur les titrages, principalement lorsqu'on oxyde.

On doit enfin envisager le facteur temps. Avant le début de tout essai, on fait dégager dans le liquide en expérience un courant de CO_2 pendant trente minutes. Cette attente est souvent nécessaire pour obtenir l'équilibre entre le milieu et les électrodes en même temps que pour chasser du liquide l'oxygène dissous.

Au cours des essais on note le potentiel juste avant chaque addition de réactif, soit toutes les trente secondes, période qui peut paraîtrelongue mais qui laisse le temps matériel nécessaire pour noter le potentiel et ajouter le réactif, et qui permet au potentiel de se fixer à une valeur aussi bien déterminée que possible ; des variations importantes et rapides de potentiel s'observent dans la partie ascendante de la courbe tandis que les amplitudes sont à peu près nulles tout au long des paliers.

Lorsqu'on cesse d'ajouter le réactif, il est bon de faire encore dégager le gaz carbonique pendant trente minutes, puis de noter une dernière fois le potentiel ; on se rend compte, de cette façon, si l'on a bien atteint le terme de l'essai et s'il ne reste pas encore dans le milieu des substances soit oxydantes, soit réductrices.

Nous avons ainsi examiné la technique et discuté ses principaux points : choix de l'oxydant, du réducteur, du gaz protecteur, mode général d'étude.

Titrage du bleu de méthylène.

Dans trois flacons d'une solution d'acide tartrique à 5 g par litre et à pH 3,1 on a dissous 50 mg, 100 mg, et 200 mg par litre de bleu de méthylène. On a réduit par $TiCl_3$ (qui amène le pH à 2,5), puis oxydé par l'iode N/10 selon la technique décrite. On obtient ainsi la courbe de la figure 3.

On observe des paliers d'autant plus nets que le taux de bleu de méthylène est plus élevé et dont la longueur (ou plus exactement l'écart

en abscisses entre les points d'inflexion qui encadrent le palier, ou points équivalents) est bien proportionnelle à ce taux de bleu de méthylène. D'autre part, les points d'inflexion de ces paliers sont bien situés au niveau du potentiel normal du bleu de méthylène (0,3 *v* environ à pH 2,5).

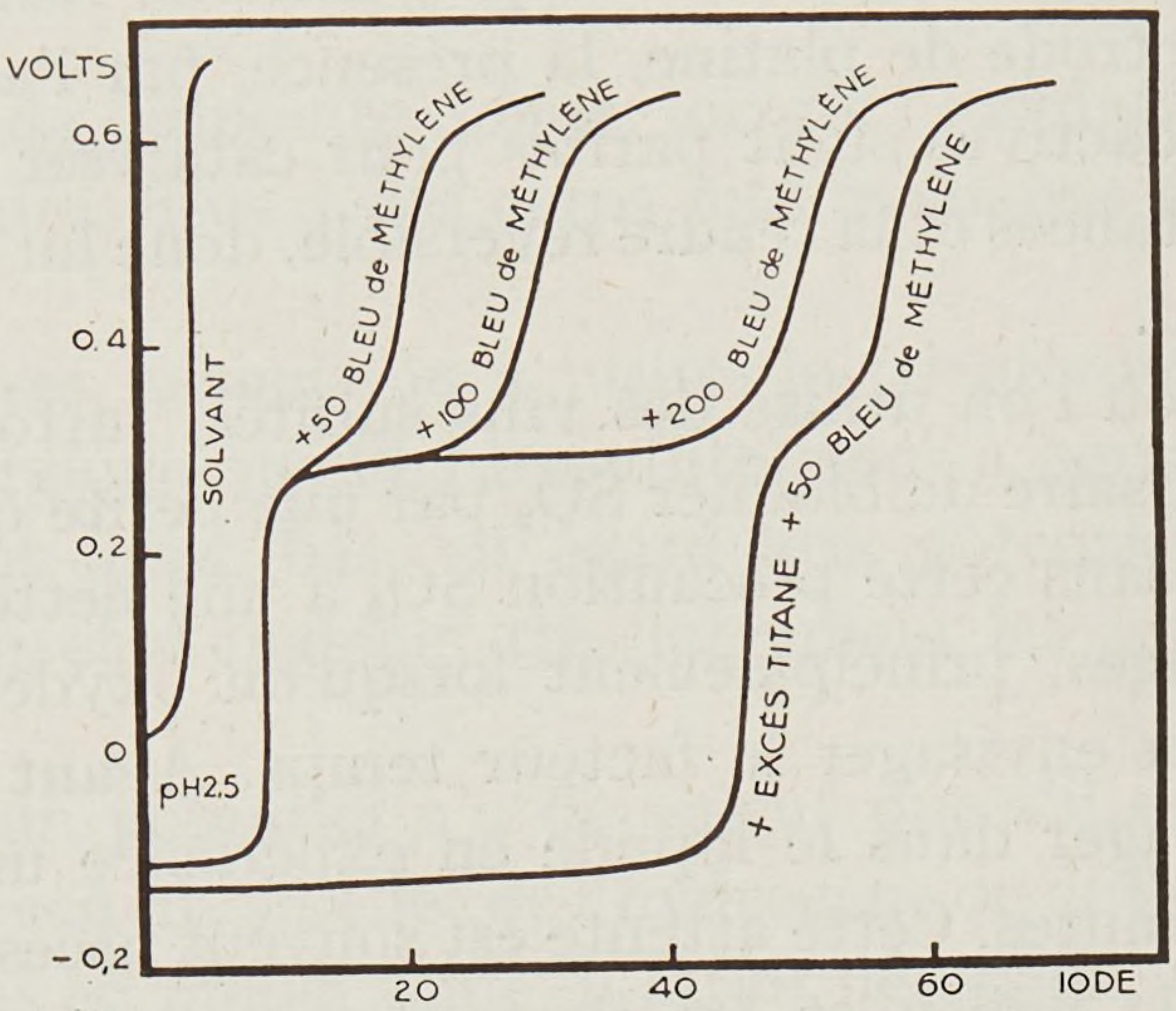


FIG. 3. — Oxydation du bleu de méthylène.

En d'autres termes, la technique permet de caractériser un système oxydo-réducteur comme le bleu de méthylène et de le doser.

Dans une autre expérience, on a volontairement ajouté un excès de $TiCl_3$ dans la solution renfermant 50 mg par litre de bleu de méthylène et on a obtenu la courbe la plus à droite du graphique dont la forme est exactement la même que celle de la première. En d'autres termes, l'excès de réducteur n'apporte aucune perturbation dans la détection et le dosage du corps oxydoréducteur.

Ces remarques sont en faveur de la technique utilisée, car nous avons longtemps essayé comme réducteur l'hydrosulfite de sodium ou dithionite, et nous n'obtenions dans la même expérience que précédemment ni la proportionnalité de la longueur du palier au taux de bleu de méthylène, ni la constance de la courbe dans le cas d'addition d'un excès de réducteur. Sans aucun doute le dithionite forme spontanément ou sous l'action d'un oxydant d'autres substances réductrices.

Il importe d'ailleurs que le pH, lors de l'oxydation du bleu de méthylène, ne soit pas sensiblement inférieur à 2,5. A pH 1,5 il apparaît des phénomènes parasites analogues à ceux observés avec le dithionite et la méthode n'est pas valable.

Signalons enfin que lors de la réduction par $TiCl_3$ le bleu de méthylène donne également des paliers très caractérisés.

Ainsi nous savons que si le vin renferme un corps oxydo-réducteur analogue au bleu de méthylène, il sera possible de le caractériser et peut-être de le doser, si du moins il est en quantité suffisante et s'il réagit

seul dans une certaine zone de potentiel, de manière à ce que le palier soit suffisamment distinct. On sait que d'une manière générale l'écart entre les potentiels normaux de deux systèmes voisins doit être au moins de 0,2 à 0,3 *v* pour qu'ils puissent être titrés séparément. Si une solution ne donne pas de paliers distincts, et nous verrons que ce sera le cas du vin à pH 3, on peut cependant essayer des fractions obtenues à partir de cette solution, afin d'avoir des courbes plus simples, ou on peut essayer de bloquer certains systèmes par un réactif convenable.

Notre technique doit donc constituer un bon outil pour aborder cette étude, et nous le croyons, la meilleure méthode de titrage potentiométrique des constituants des vins lorsquon les considère aux pH normaux et dans les zones habituelles de leur potentiel. C'est dans ces conditions que l'on est le plus assuré de saisir les systèmes oxydo-réducteurs du vin dans l'état même où ils sont et où ils réagissent dans ce liquide.

Nous avons essayé de la même manière d'autres colorants que le bleu de méthylène. Nous avons obtenu de bons résultats avec certains, médiocres ou mauvais avec d'autres, en ce sens que le palier n'était pas situé au niveau prévu, correspondant au potentiel normal de ce colorant. Voici, toujours à pH 2,5, les paliers que nous avons observés en regard des potentiels (tous positifs) donnés par les auteurs.

	Donnés	Trouvés
Dichlorophénolindophénol	480	528
Bleu de toluylène	385	375
Bleu de crésol	340	332
Violet de Lauth	330	312
Bleu de Nil	150	115
Disulfonate d'indigo	125	145

Il est possible que certains des colorants que nous avons utilisés ne soient pas des produits purs ou bien conservés. Il se peut aussi que certains de ces colorants réagissent sur l'acide tartrique de la solution.

Titrage des sels de fer et de cuivre.

Dans une solution à 5 g par litre d'acide tartrique, on a ajouté 20 ml par litre de sulfate ferreux M/80, et 20 ml par litre de sulfate de cuivre M/80. Le pH a été amené à 3,2.

En réduction on observe un palier régulier à 0,16 *v* à et en oxydation par l'iode un palier régulier à — 0,05 *v* alors que les potentiels normaux sont de 0,71 pour le fer et 0,15 pour le cuivre, indépendants du pH. Pour interpréter ces faits, il faudrait tenir compte de la formation de complexes plus ou moins dissociés entre l'acide tartrique qui est un acide-alcool et les ions ferreux, ferriques, cuivreux et cuivriques, et d'autre part de l'interaction des systèmes Fe^{++}/Fe^{+++} et Cu^{+}/Cu^{++}, la réduction de ce dernier pouvant en outre conduire à la formation de cuivre colloïdal.

Titrage de l'acide sulfureux.

Une solution tartrique à 5 g/l à pH 3,2 a été additionnée de 90 mg par litre de SO_2, réduite par $TiCl_3$ qui l'amène à pH 2,5, puis oxydée par l'iode N/10 en l'absence ou en présence de formol non polymérisé (3 p. 100).

La figure 4 donne la courbe du titrage de SO_2, dont l'effet est complètement annulé par le formol, puisque la courbe est, en présence de formol, à peu près confondue avec celle que donne le solvant pur.

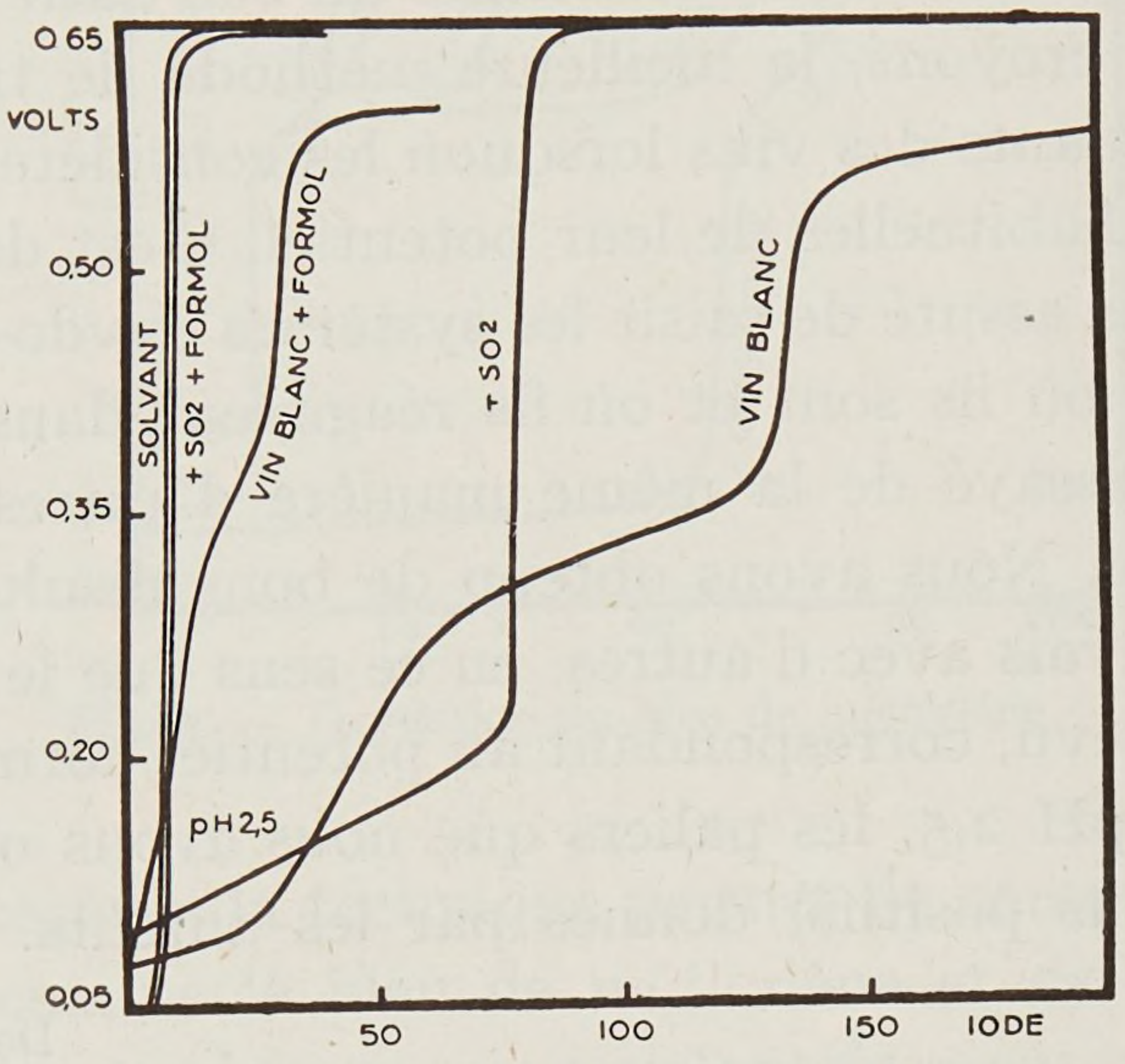


FIG. 4. — Acide sulfureux et vin blanc.

Par comparaison, la figure 4 donne les courbes de titrage d'un vin blanc sulfité non dilué, sans et avec addition de formol (5 p. 100). Dans la mesure où le formol ne bloque que SO_2 on peut conclure que SO_2 est le principal corps oxydable de ce vin, mais que cependant, il en renferme d'autres auxquels correspond la courbe marquée « vin blanc + formol ».

Si on titre par $TiCl_3$ une solution de SO_2, la courbe ne se confond pas avec celle du solvant pur ; il y a consommation de réducteur. Ici la courbe n'est pas modifiée par addition de formol.

Nous avons effectué des titrages de vins blancs purs ou dilués au cinquième, en présence de bleu de méthylène, en réduction et en oxydation. Le palier du bleu de méthylène est exactement placé et bien délimité. Il est plus long qu'en solution simple pour un même taux de bleu de méthylène, ce qui signifie qu'en présence de ce colorant des constituants du vin se réduisent et s'oxydent au niveau de son potentiel normal. Pour certains vins cependant les paliers ont la même longueur et les vins sans bleu de méthylène, se comportent en oxydation et en réduction à peu près comme une solution d'acide tartrique, ce qui signifie que ces vins ne renferment pas ou très peu de substances oxydables ou réductibles. Quoi qu'il en soit, pour la détection et le titrage de ces constituants, la présence de bleu de méthylène ne semble pas présenter de supériorité.

Titrage de l'acide ascorbique.

Une solution d'acide tartrique à 5 g par litre et à pH 3,2 a été additionnée de 300 mg par litre d'acide ascorbique avec ou sans 20 ml par litre de bleu de méthylène M/40 dont l'effet est, selon un principe général, de catalyser la transformation redox de l'acide ascorbique et de lui communiquer un potentiel normal défini.

En réduction (fig. 5) on constate en effet que l'acide ascorbique lorsqu'il est seul, réagit sur le titane mais sans présenter de palier caractéristique. Au contraire, en présence de bleu de méthylène, on constate que l'effet de l'acide ascorbique se concentre au niveau du palier correspondant au bleu de méthylène ; au delà du palier, la courbe de la chute du potentiel est beaucoup plus verticale qu'en l'absence de bleu de méthylène. Rappelons qu'à pH 3,2 les potentiels normaux du bleu de méthylène et de l'acide ascorbique sont respectivement 0,26 *v* et 0,30 *v*.

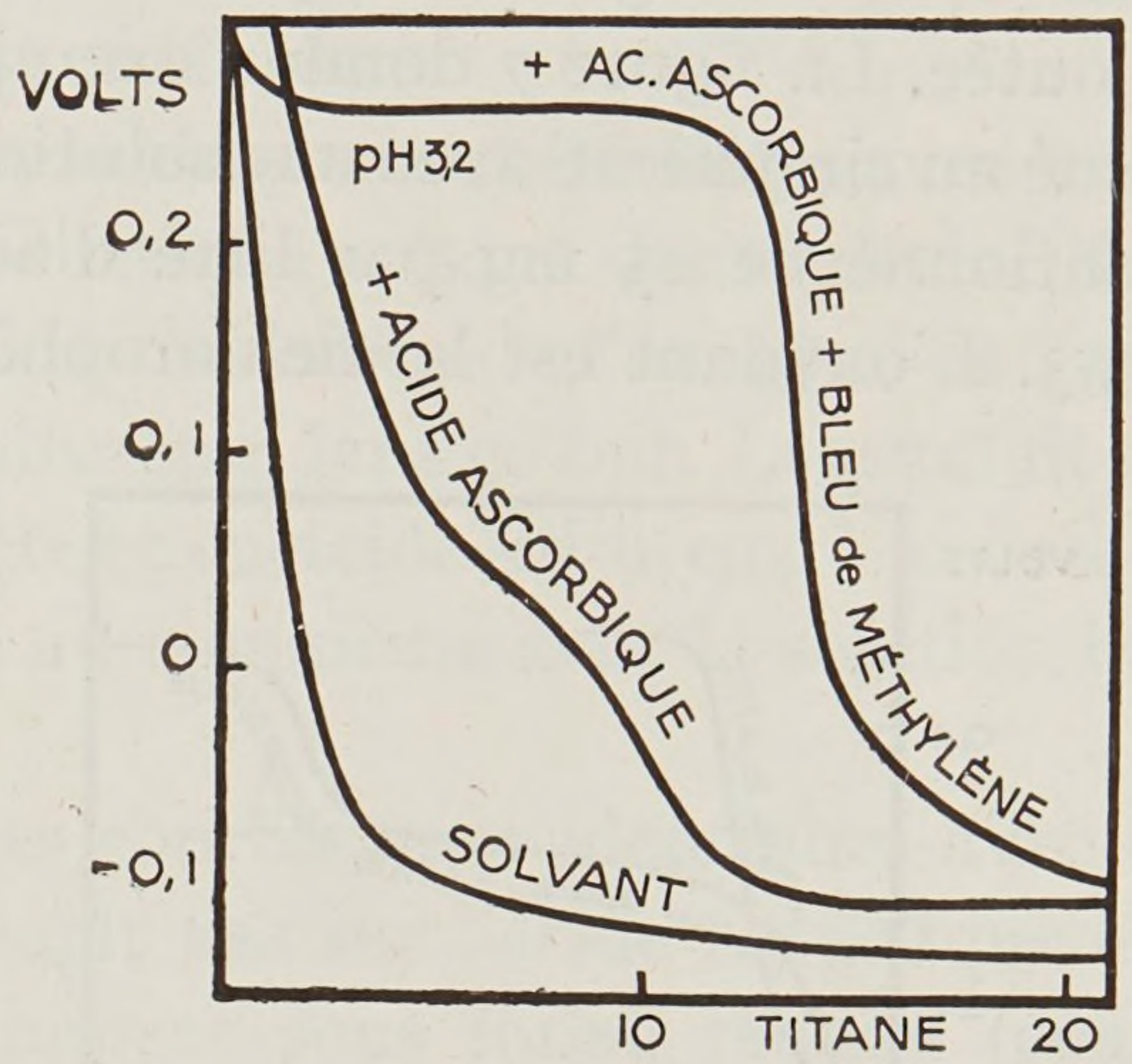


FIG. 5. — Réduction de l'acide ascorbique.

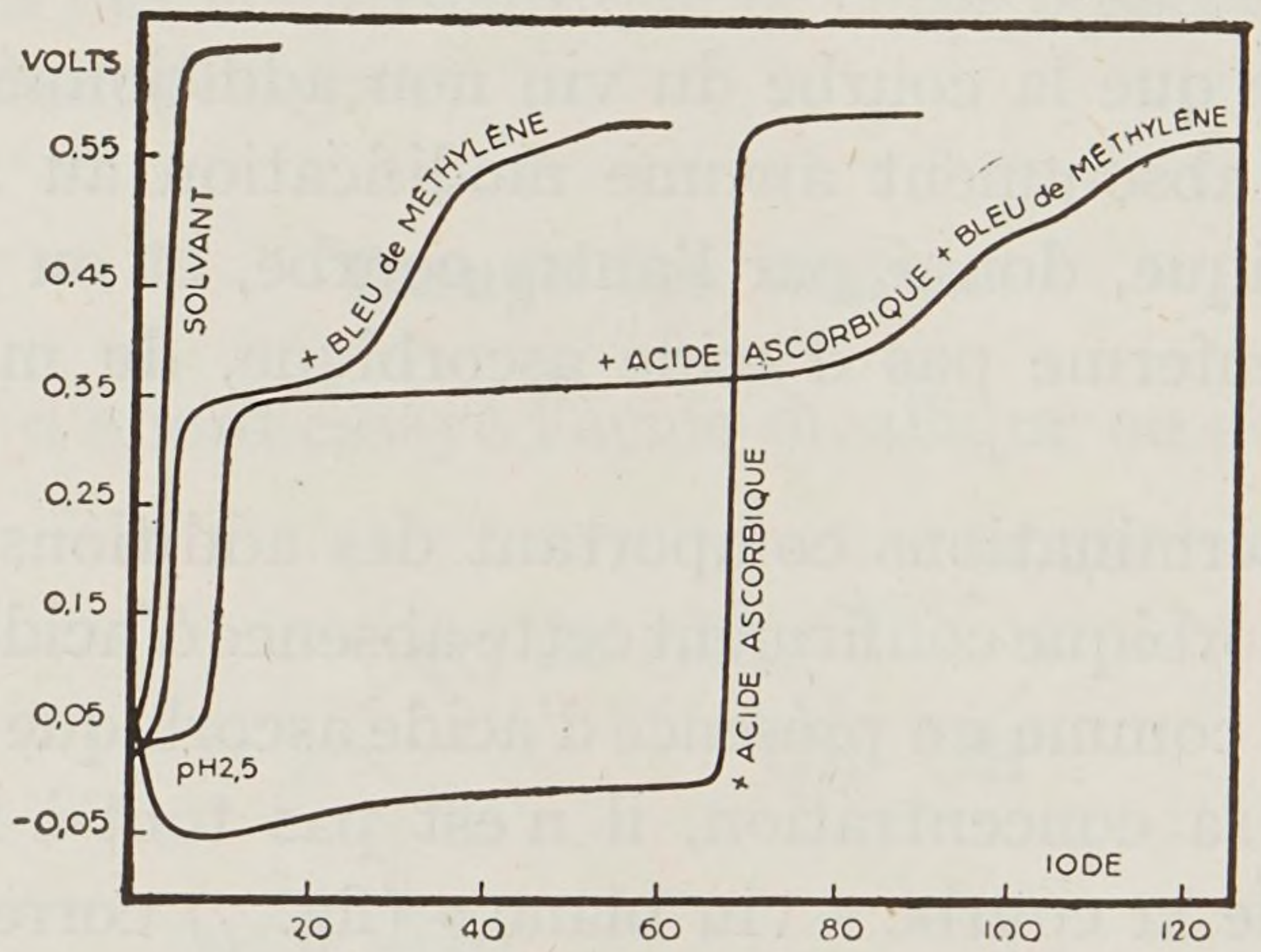


FIG. 6. — Oxydation de l'acide ascorbique.

En oxydation (fig. 6) l'acide ascorbique lorsqu'il est seul donne une

courbe d'abord horizontale. La présence de bleu de méthylène remet en quelque sorte le palier de l'acide ascorbique à sa place en le confondant avec la sienne et bien entendu en l'allongeant. Si le palier est plus élevé qu'en réduction, c'est parce que le pH est plus bas par l'effet du chlorure de titane.

On constate que les sels de fer et de cuivre (20 ml par litre de solution M/80) n'ont nullement l'effet du bleu de méthylène.

Si maintenant on met en présence de l'acide ascorbique et un vin blanc, on observe un point d'inflexion correspondant au potentiel normal de ce corps et un palier dont la longueur est porportionnelle à la quantité d'acide ascorbique ajoutée. La figure 7 donne l'exemple d'un vin pauvre en sucre et en SO_2, dilué au cinquième avec une solution d'acide tartrique, le mélange étant additionné de 25 mg par litre d'acide ascorbique. Le pH du mélange est 3,3. L'oxydant est le dichlorophénolindophénol.

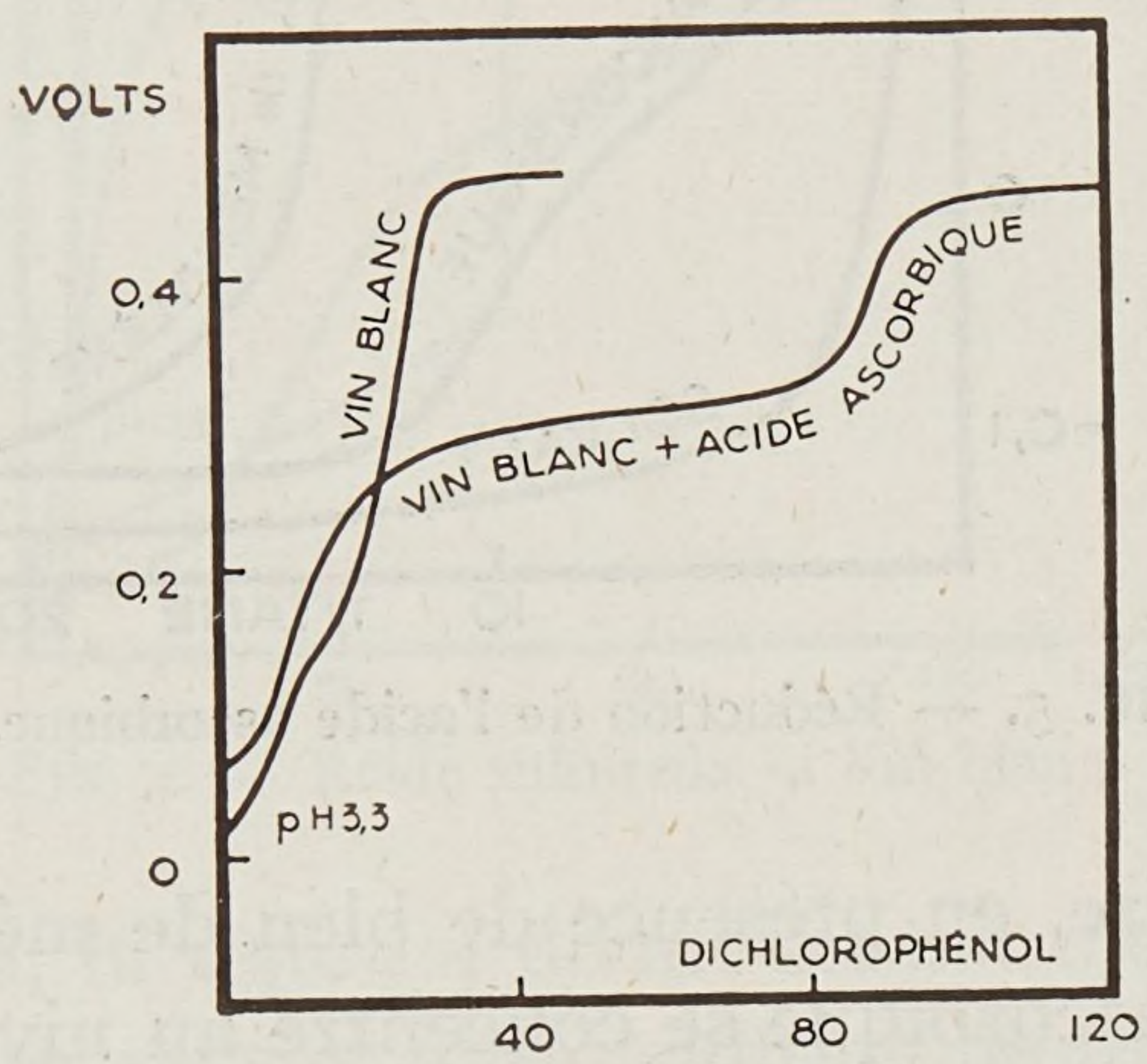


FIG. 7. — Acide ascorbique et vin blanc.

On remarque que la courbe du vin non additionné d'acide ascorbique ne présente absolument aucune modification au niveau du palier de l'acide ascorbique, donné par l'autre courbe, et on peut en conclure que ce vin ne renferme pas d'acide ascorbique, du moins en quantité notable.

D'autres déterminations comportant des additions quatre fois plus faibles d'acide ascorbique confirment cette absence d'acide ascorbique dans le vin. Toutefois, comme en présence d'acide ascorbique le palier s'abaisse lorsque diminue sa concentration, il n'est pas tout-à-fait exclu que la légère inflexion de la courbe « vin blanc » (fig. 7) corresponde en partie à la présence d'une très faible porportion d'acide ascorbique.

Il faut rappeler que J. BARAUD, utilisant la réaction de la tartrazine, a démontré que les vins ne renferment pas d'acide ascorbique contrairement aux idées antérieures. Notre technique paraît bien donner une confirmation de ce point important.

Ajoutons que l'addition de formol lors de l'oxydation par le dichlorophénolindophénol fait disparaître complètement l'effet de l'acide ascorbique.

Titrage de la réductone.

Des expériences analogues ont été faites avec la réductone (CHOH = COH — CHO) à la dose de 200 mg par litre. Elle donne des courbes à pentes assez régulières, sans palier et sans inflexion caractéristique, en oxydation comme en réduction. On n'obtient pas davantage de palier en présence de vin blanc. Il n'a pas été fait d'expérience en présence de bleu de méthylène.

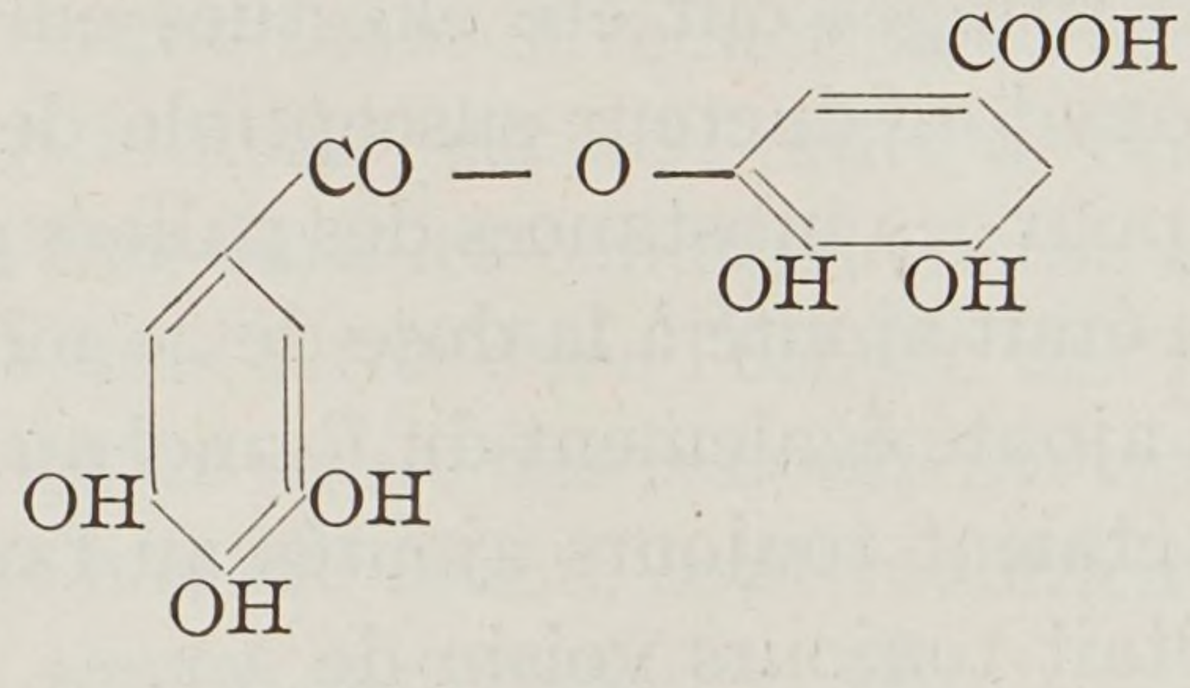
Des expériences analogues ont été faites avec un produit proposé sous le nom d'« acide réductique » (sans doute dérivé de la réductone) pour protéger les vins contre les effets de l'oxygène de l'air et éventuellement remplacer l'acide sulfureux dans ce but. Le produit a été ajouté à un vin blanc pauvre en sucre et en acide sulfureux à la dose de 250 mg par litre et le vin a été dilué au cinquième avec la solution habituelle d'acide tartrique.

En réduction les courbes sont identiques avec ou sans acide réductique, le $TiCl_3$ ne réagit pas sur l'acide réductique et ceci indique que le produit était entièrement sous forme réduite (contrairement à l'acide ascorbique). En oxydation le produit est extrêmement actif ; il donne un long palier parfaitement défini, mais dont le niveau dépend de l'oxydant : 0,32 *v* avec le dichlorophénolindophénol, 0,07 *v* avec l'iode et de nouveau 0,32 avec l'iode en présence de bleu de méthylène.

Des essais plus poussés permettraient de prévoir dans quelle mesure ce corps est susceptible de freiner l'élévation du potentiel d'un vin aéré. Mais nous voyons dès maintenant que ce corps possède un pouvoir tampon élevé au potentiel 0,32 *v*.

Titrage des tanins.

Nous avons d'abord essayé l'acide digallique ou acide tannique.



Les tanins pyrogalliques sont des glucosides de ce corps. Dans le tanin de chêne 5 molécules d'acide digallique sont combinées par leur fonction acide aux cinq fonctions alcool d'une molécule de glucose.

Un premier échantillon, au taux de 0,6 g par litre, n'a pas modifié la réaction en réduction, c'est-à-dire qua la courbe de titrage par le titane de la solution tartrique à pH 3,2 se confond à très peu près avec la courbe donnée par la solution tartrique pure. Par contre dans le titrage par l'iode, il donne une courbe analogue à celle de la figure 9.

On a ensuite utilisé l'acide tannique pur Prolabo, à la dose de 0,6 g par litre toujours dans la même solution tartrique. Il réagit aussi bien en réduction qu'en oxydation, conformément aux courbes 9 et 10. Ce corps consomme de l'oxydant entre les potentiels 0,30 et 0,55 *v*.

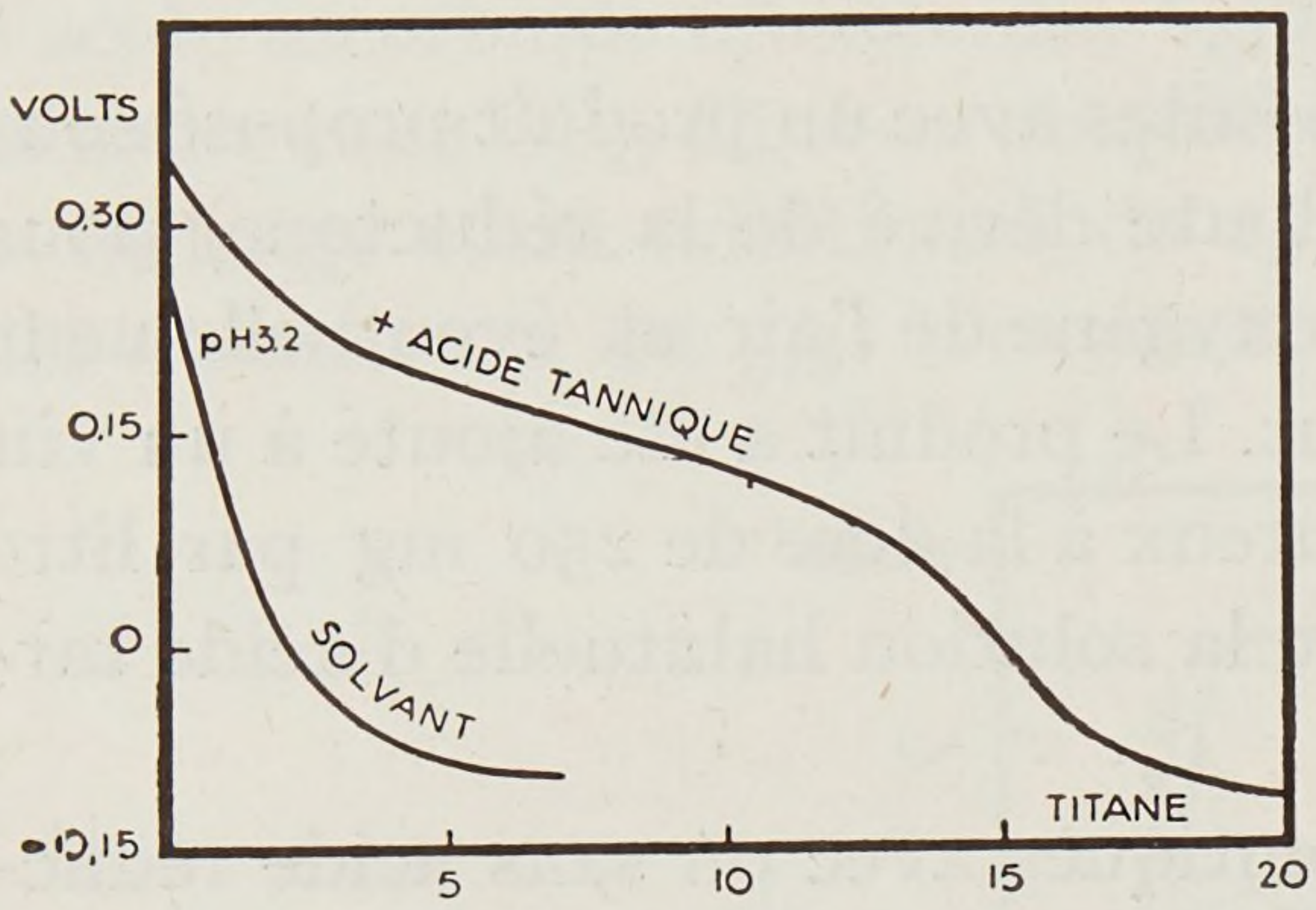


FIG. 8. — Réduction de l'acide tannique.

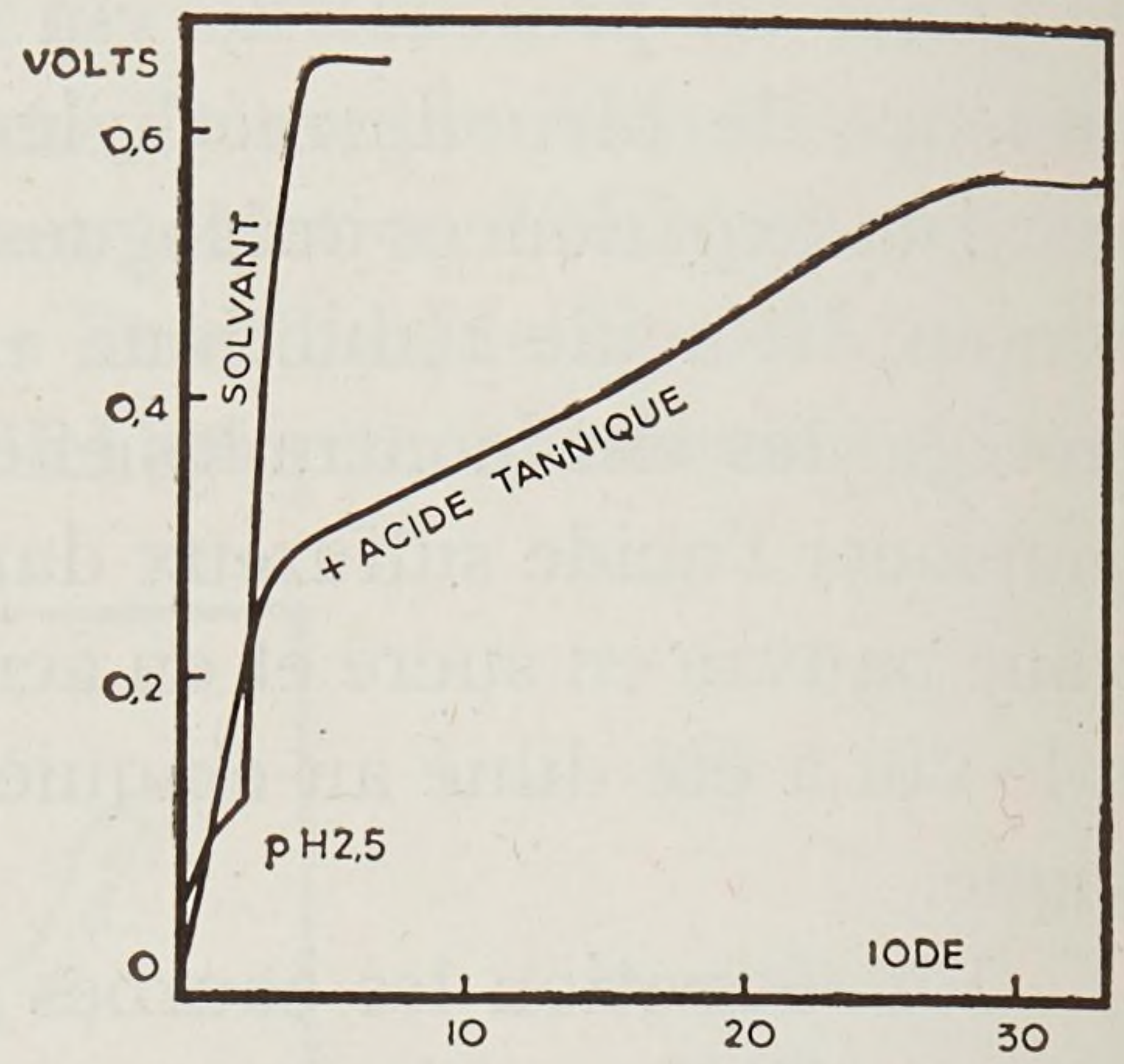


FIG. 9. — Oxydation de l'acide tannique.

On a essayé selon la même technique des tanins d'origines diverses, à l'eau, à l'alcool ou à l'éther, à la même dose de 0,6 g par litre, et on a observé pour tous ces tanins, aussi bien en réduction qu'en oxydation, des courbes ayant tout à fait le même allure que celle de l'acide tannique (fig. 8 et 9). Les légères différences peuvent être dues à la nature du tanin, mais aussi au taux d'impuretés et peut-être même à la nature de ces impuretés qui peuvent ou non être actives.

Ces tirages on été refaits de la même manière, en présence de formol (50 ml par litre), car lorsqu'on titrera des vins, l'addition de formol pourra être indiquée pour bloquer l'acide sulfureux ; on a constaté que les courbes conservaient la même allure en oxydation comme en réduction.

Enfin, les mêmes titrages ont été effectués en présence de bleu de méthylène, système oxydo-réducteur susceptible de réagir sur les polyphénols et de donner pour ces substances des paliers plus caractéristiques. Le bleu de méthylène était ajouté à la dose de 20 ml par litre de solution à 4,7 g par litre. On a ajouté également du formol au même taux de 50 ml par litre. Les tanins étaient toujours ajoutés au taux de 0,6 g par litre et le pH à l'origine était toujours voisin de 3,2.

Dans ces conditions, on a obtenu les courbes 10 et 11 qu'il faut comparer aux courbes 8 et 9. En réduction, le palier du bleu de méthylène apparaît bien au voisinage de son niveau normal. En oxydation toute

la réaction se concentre à un potentiel bas, voisin de 0, fait que nous ne sommes pas actuellement en mesure d'interpréter. On observera un résultat opposé avec les anthocyannes dont le niveau d'oxydation en présence de bleu de méthylène s'élève au niveau de l'oxydation du bleu de méthylène.

Quoi qu'il en soit une meilleure connaissance du comportement des tanins permettra de distinguer l'effet de ces substances dans l'application de cette technique à l'étude des vins rouges.

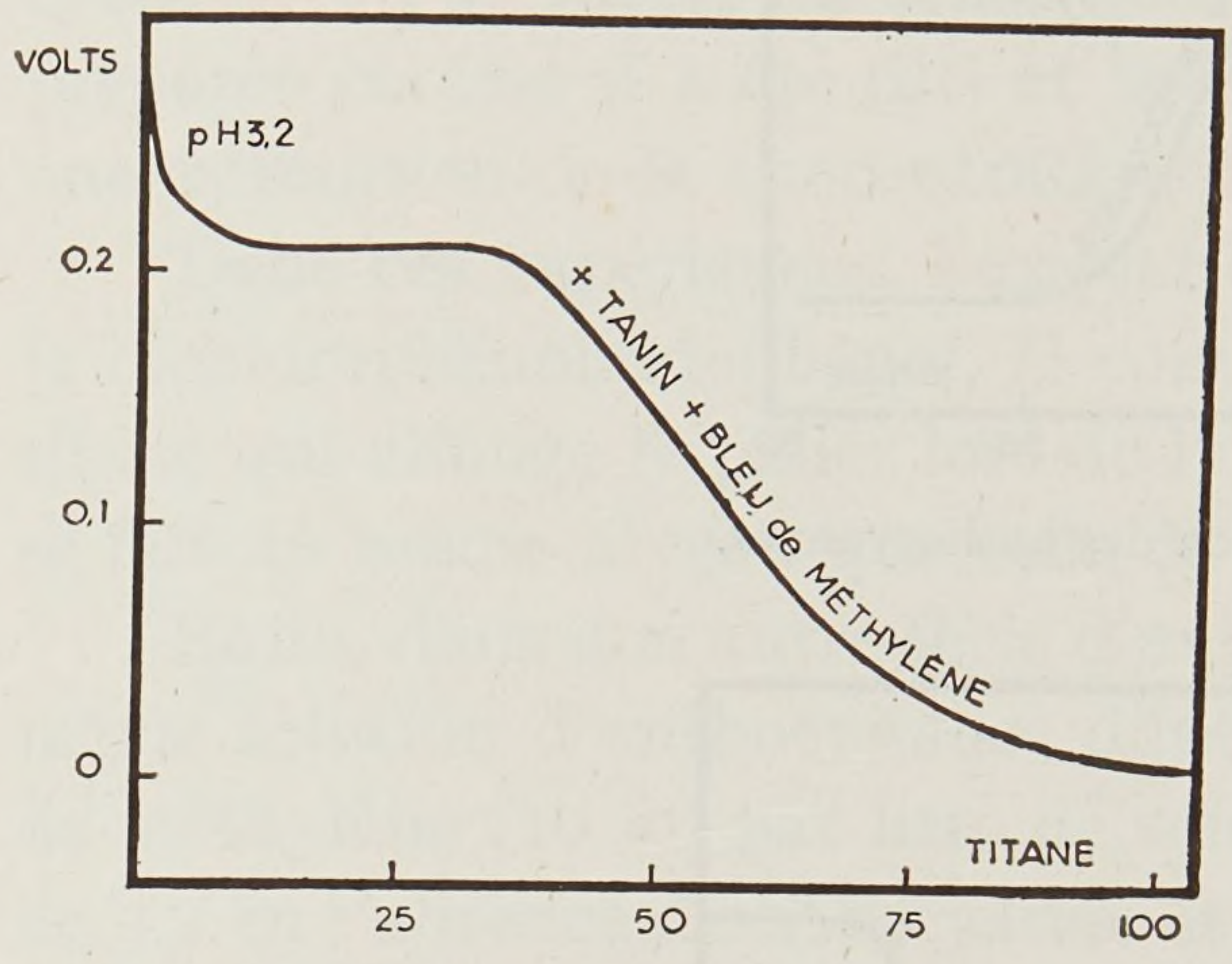


FIG. 10. — Réduction du tanin en présence de bleu de méthylène.

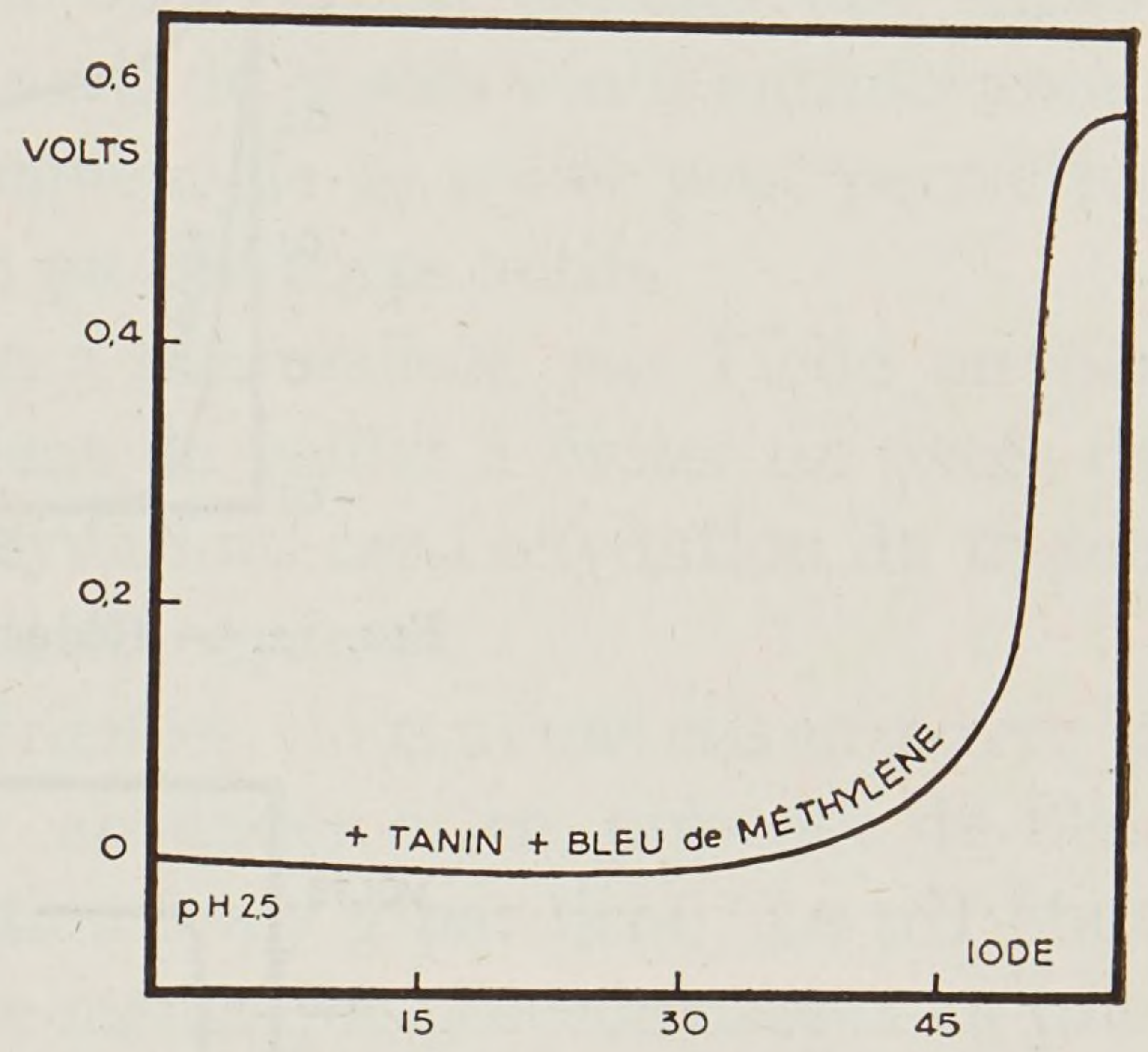


FIG. 11. — Oxydation du tanin en présence du bleu de méthylène.

Titrage de solutions d'anthocyannes.

On a d'abord utilisé une solution d'anthocyannes obtenues par macération, dans une solution alcoolique à 10 p. 100 additionnée de 1. p 100 d'acide chlorhydrique, de pellicules pressurées et lavées du cépage Merlot. La solution obtenue par filtration de cette liqueur de macération a été diluée dix fois avec une solution d'acide tartrique à 5 g par litre, le pH du mélange étant égal à 2,9 au début de la réduction et à 2,2 au début de l'oxydation. Nous avons obtenu les courbes des figures 12 et 13.

En réduction, la courbe présente un palier très net et un point d'inflexion à 0,25 *v*. Presque toute la réduction s'accomplit au niveau de ce potentiel qui, il faut le noter, est de l'ordre des potentiels rencontrés normalement dans les vins dans les conditions habituelles de leur conservation, autrement dit qui se situe dans l'échelle des potentiels habituels. Il faut donc admettre qu'au cours des traitements normaux des vins, les anthocyannes subissent une réduction, cette modification ayant certainement une répercussion sur les caractères du vin.

Il faut seulement faire, pour le moment, cette réserve que l'effet n'est peut-être pas dû aux anthocyannes mêmes, mais à des corps qui les accompagnent, peut-être à des polyphénols ou encore à des aglucones

conformément aux travaux de TCHOGOVADZÉ qui, nous l'avons signalé, considère certaines aglucones comme des systèmes redox catalysant l'oxydation des constituants du vin par l'oxygène de l'air. Il se peut aussi, si les anthocyannes sont actives, qu'elles ne le soient pas toutes au même degré, car le raisin en renferme six ou huit différentes.

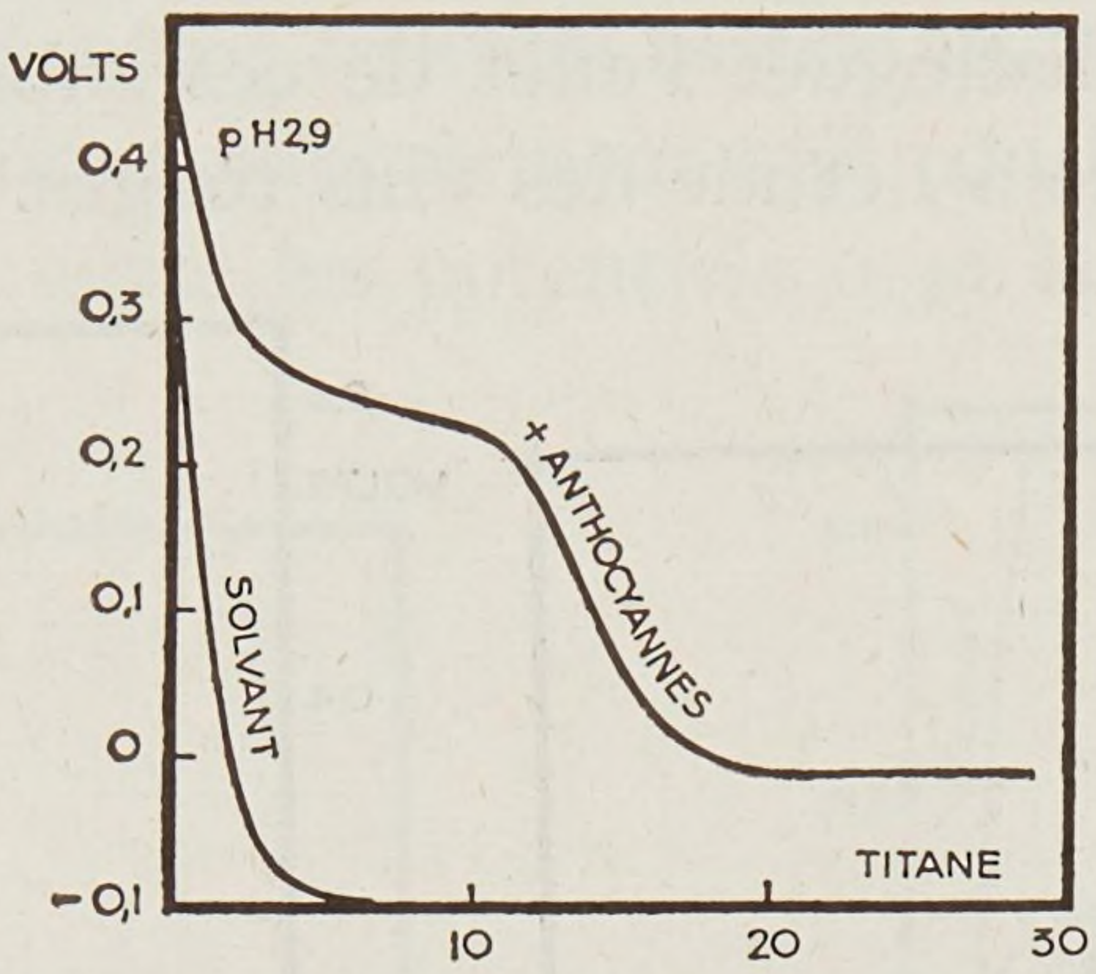


FIG. 12. — Réduction des anthocyannes.

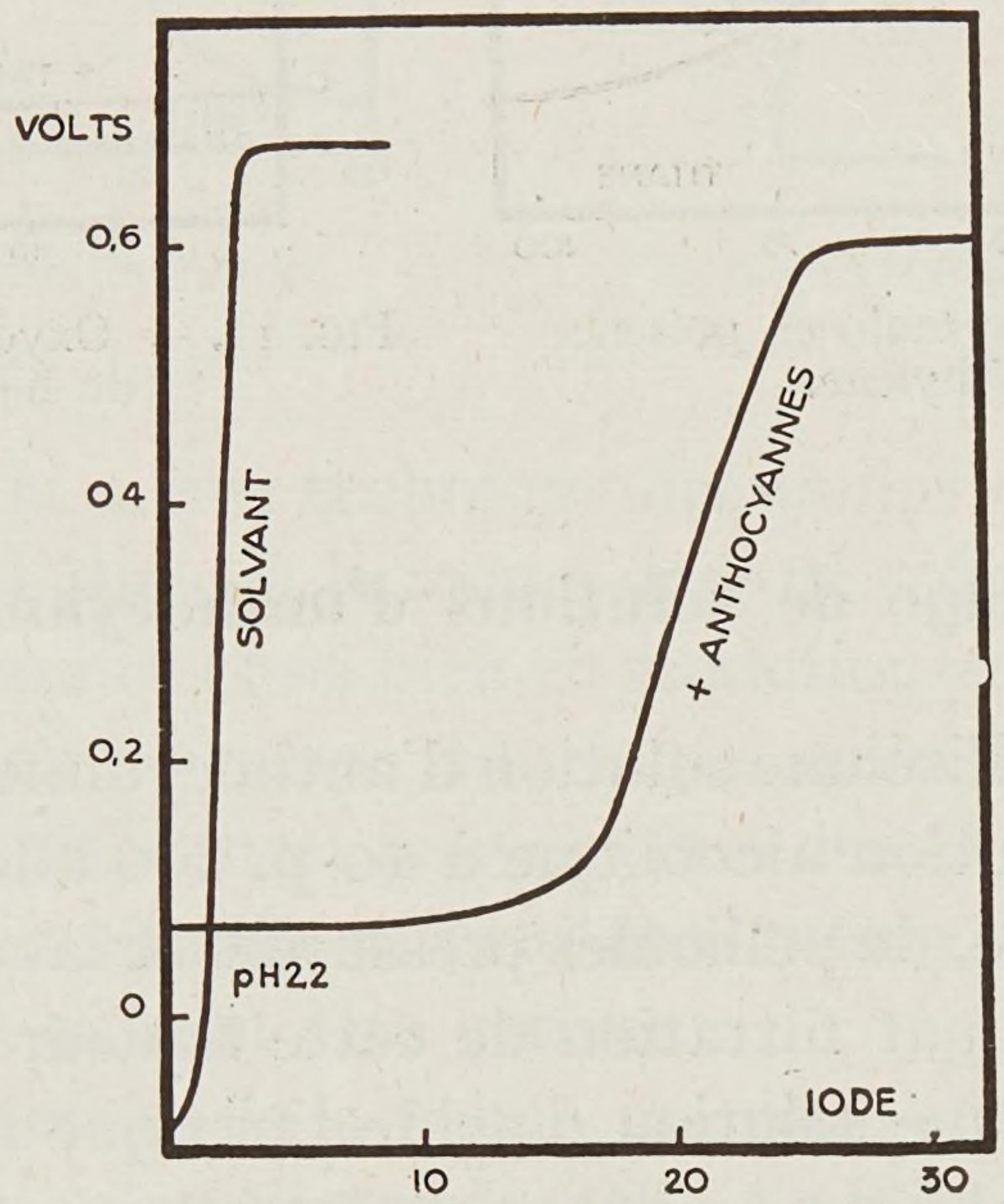


FIG. 13. — Oxydation des anthocyannes.

En oxydation la courbe commence par une partie horizontale située très bas, à 0, 07*v* ; par conséquent dès qu'un vin reçoit de l'oxygènt dissous, les anthocyannes (ou les substances actives qui les accompagnene dans les macérations étudiées) doivent être réoxydées. En utilisant comme oxydant le dichlorophénolindophénol au lieu de l'iode, on obtient une courbe tout à fait identique.

L'addition de formol ne modifie pas les courbes en oxydation et, par conséquent, pourra être utilisée dans l'application de la technique à l'étude des vins. Par contre, les courbes en réduction sont modifiées, le palier est atténué sans changement du niveau.

On notera la différence profonde de comportement des tanins précédents et des anthocyannes qui sont les uns et les autres des polyphénols.

Dans une série d'expériences on a mis en œuvre la solution d'anthocyannes à différents taux : *a*) à la même concentration que précédemment, *b*) deux fois moins, *c*) deux fois plus.

On a obtenu les résultats suivants : en oxydation et en réduction la longueur du palier augmente avec la concentration en anthocyannes et lui est à peu près proportionnelle, bien que l'inflexion s'atténue quand le taux diminue ; les paliers sont donc bien caractéristiques des anthocyannes (ou du moins du constituant actif de la solution d'anthocyannes préparée comme il a été dit) et la longueur de ce palier peut permettre une estimation de la concentration du ou des corps actifs.

Dans ces expériences, l'oxydation a été réalisée par l'iode ou par le dichlorophénolindophénol. Il convient de veiller à éviter un excès de titane qui allonge le palier lors de l'oxydation, car l'oxydation du titane se fait au même niveau que celle de l'anthocyanne.

Enfin, dans une autre série d'expériences, nous avons mis en œuvre la même solution d'anthocyannes diluée au dixième, en présence de bleu de méthylène (10 ml par litre de solution à 4,7 g par litre). Le pH était de 3,2 en l'absence d'anthocyanne et le même que précédemment en présence d'anthocyannes, soit 2,9 au début de la réduction et 2,2 au début de l'oxydation.

Nous avons en somme renouvelé les expériences faites précédemment avec le tanin. On a dressé ainsi les courbes 14 et 15.

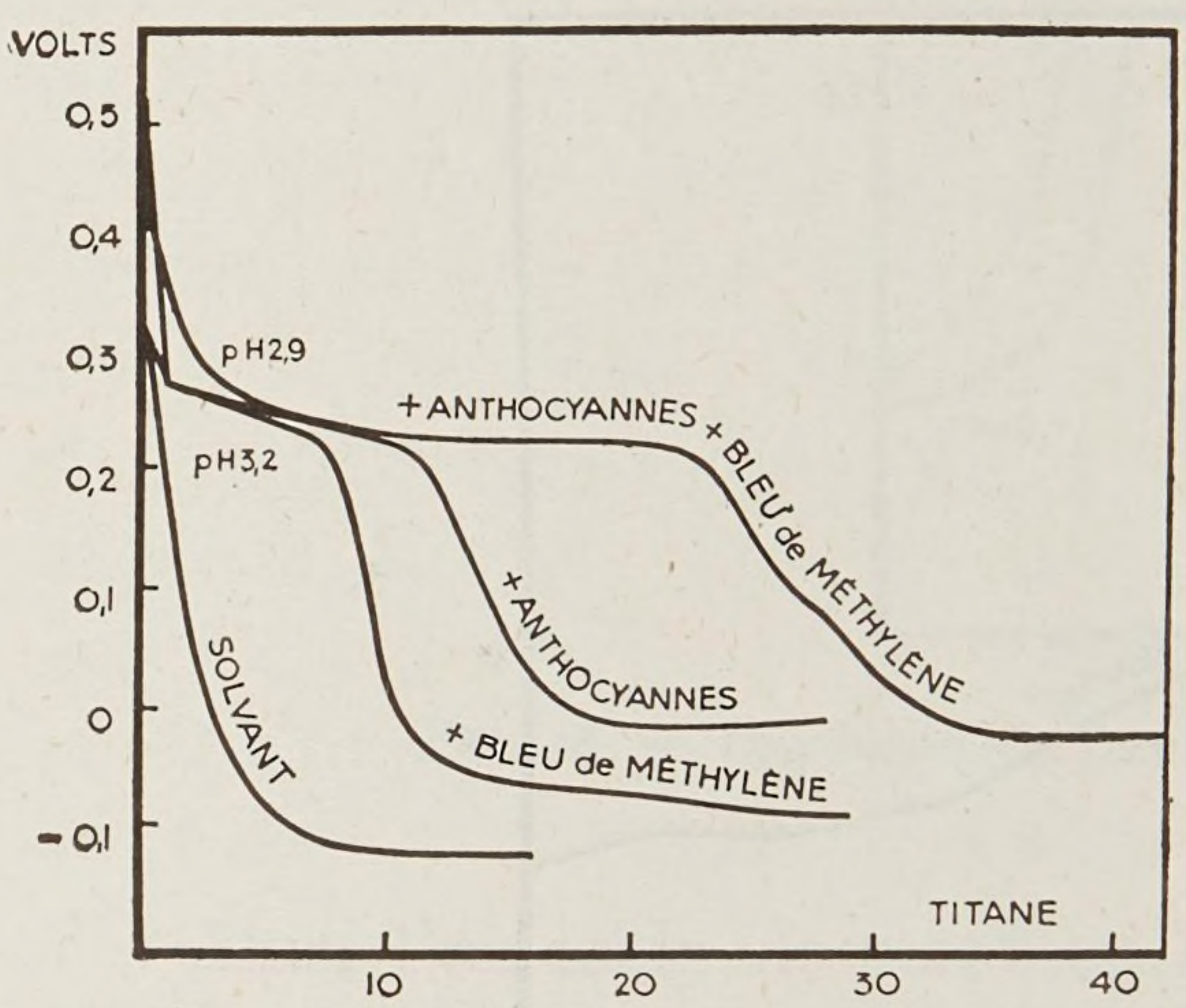


FIG. 14. — Réduction des anthocyannes en présence de bleu de méthylène.

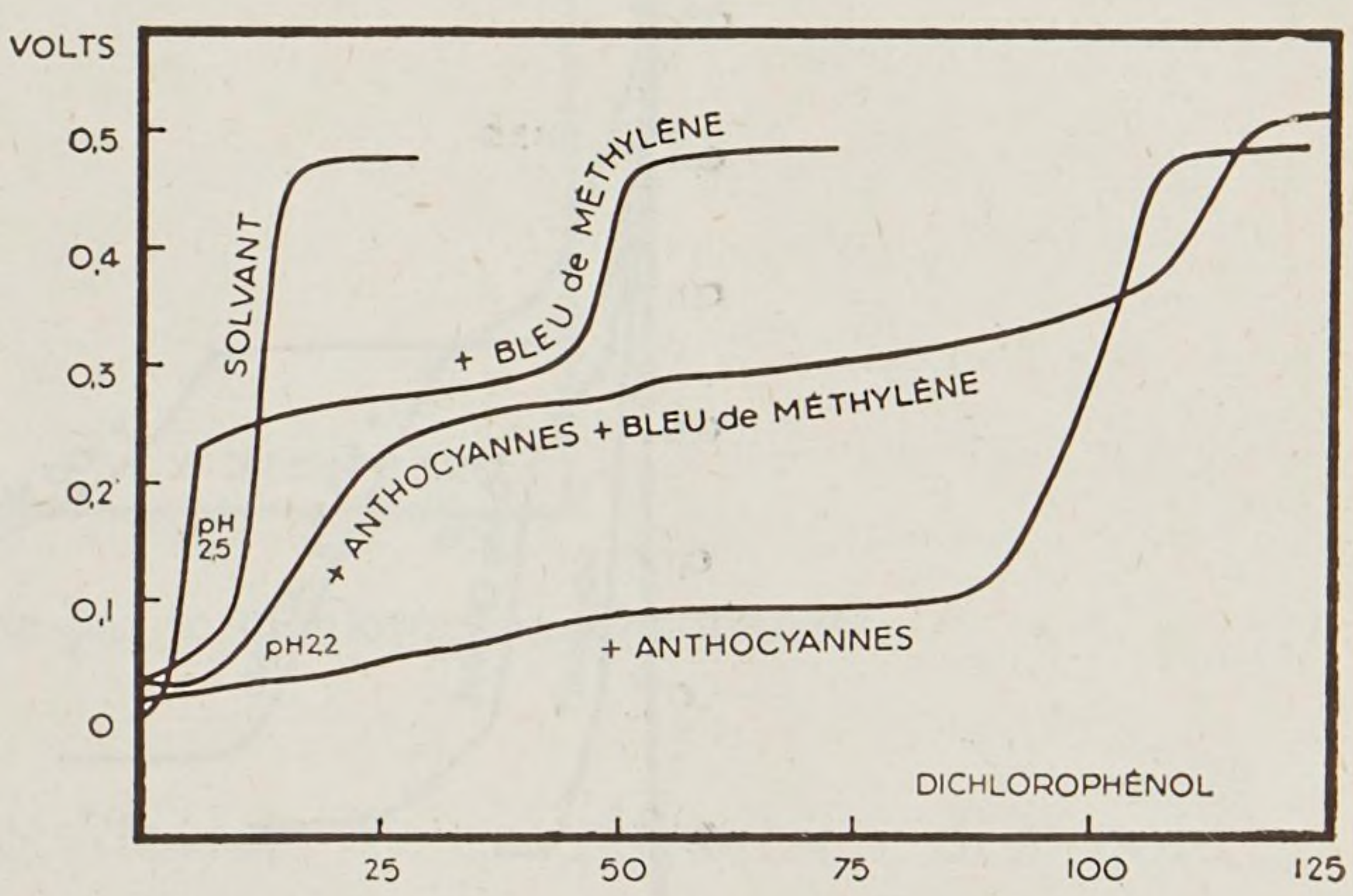


FIG. 15. — Oxydation des anthocyannes en présence de blen de méthylène

En oxydation, les effets du bleu de méthylène et de la solution d'anthocyannes, se concentrent sur le même palier qui est celui du bleu de méthylène. En réduction le palier des anthocyannes est au niveau de celui du bleu de méthylène et les longueurs des deux paliers s'ajoutent. Finalement le palier est à très peu près au même niveau en oxydation et

en réduction (à un écart près qui correspond à la différence de pH). Les substances présentes constituent un véritable système oxydo-réducteur réversible, de potentiel normal voisin de 0,26 *v* à pH 3.

On peut exprimer ce fait en disant que les constituants de notre macération se comportent comme les substances faiblement électroactives de WURMSER. Elles constitueraient bien des systèmes oxydo-réducteurs, mais ne présentent pas de potentiel normal défini, à moins qu'elles ne se trouvent en présence de substances fortement électroactives, comme le bleu de méthylène qui joue le rôle de catalyseur de la transformation redox du premier système.

Titrage de l'œnine.

L'œnine (ou œnoside) est le monoglucoside de l'œnidine (ou malvidol). On a utilisé du picrate d'œnoside préparé au laboratoire par Pascal RIBÉREAU-GAYON à l'occasion de ses études sur la séparation et l'identification des anthocyannes des raisins (9). A partir des solutions étudiées dans le paragraphe précédent, après précipitation par l'éther et redissolution, l'acide picrique précipite l'œnine sous forme de longues aiguilles rouges.

En réduction, à pH 3 au départ, trois doses ont été essayées et ont donné les courbes de la figure 16. On constate que pour une addition suffisante, l'œnoside donne un palier très accusé au potentiel 0,26 *v*, résultat qui semble devoir être remarqué.

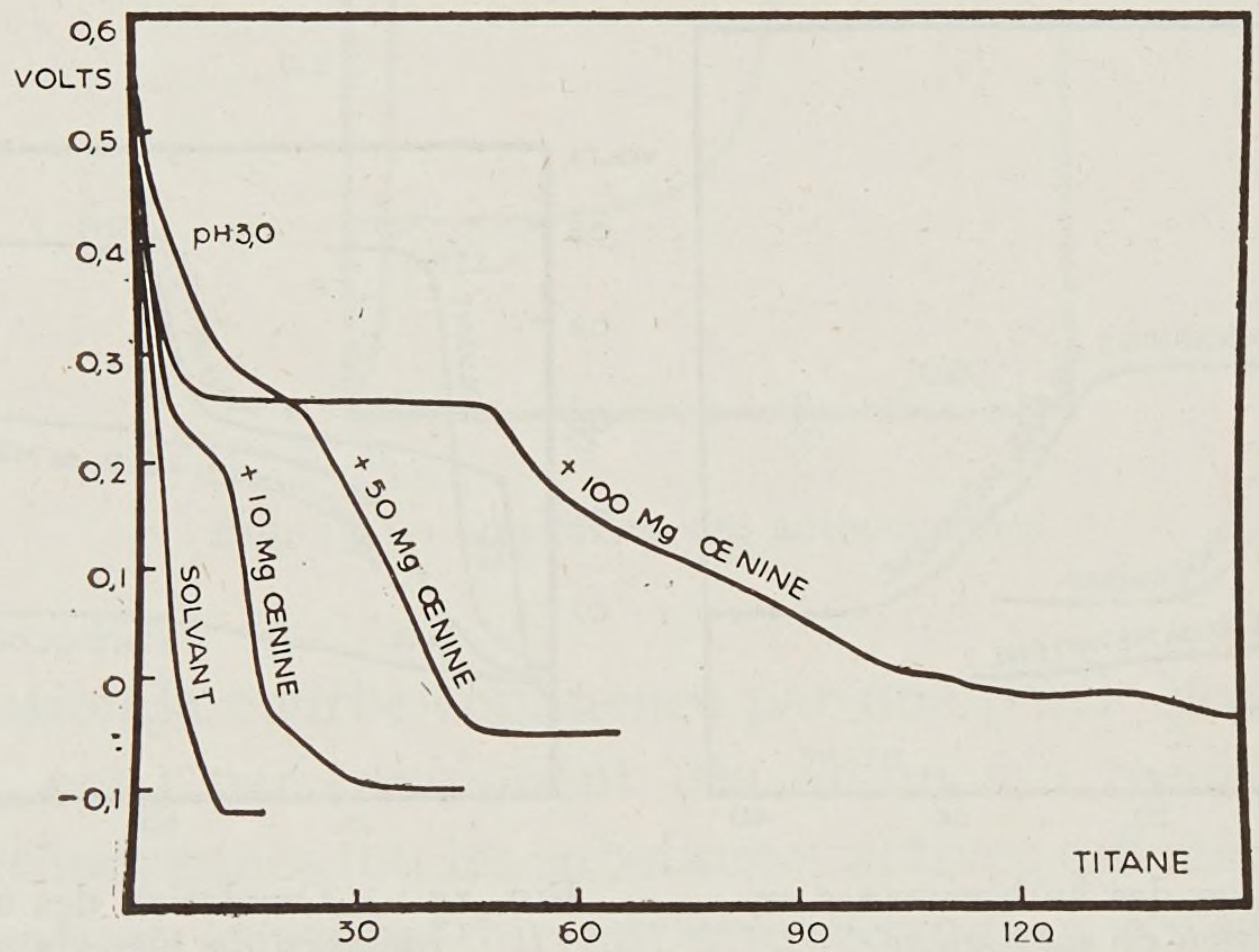


FIG. 16. — Réduction de l'œnine.

L'oxydation par l'iode (fig. 17), qui peut former une combinaison avec l'œnine, ne donne pas de palier.

Par contre l'oxydation par le dichlorophénolindophénol (fig. 18) donne un palier caractéristique au potentiel 0,40 *v* à pH 1,5 (le pH est

très bas car il a fallu beaucoup de $TiCl_3$) ce qui correspond à 0,30 *v* environ à pH3 ; ce potentiel est voisin de celui observé sur la courbe en réduction. La présence dans le milieu de 20 p. 100 de vin blanc n'a pas modifié la courbe.

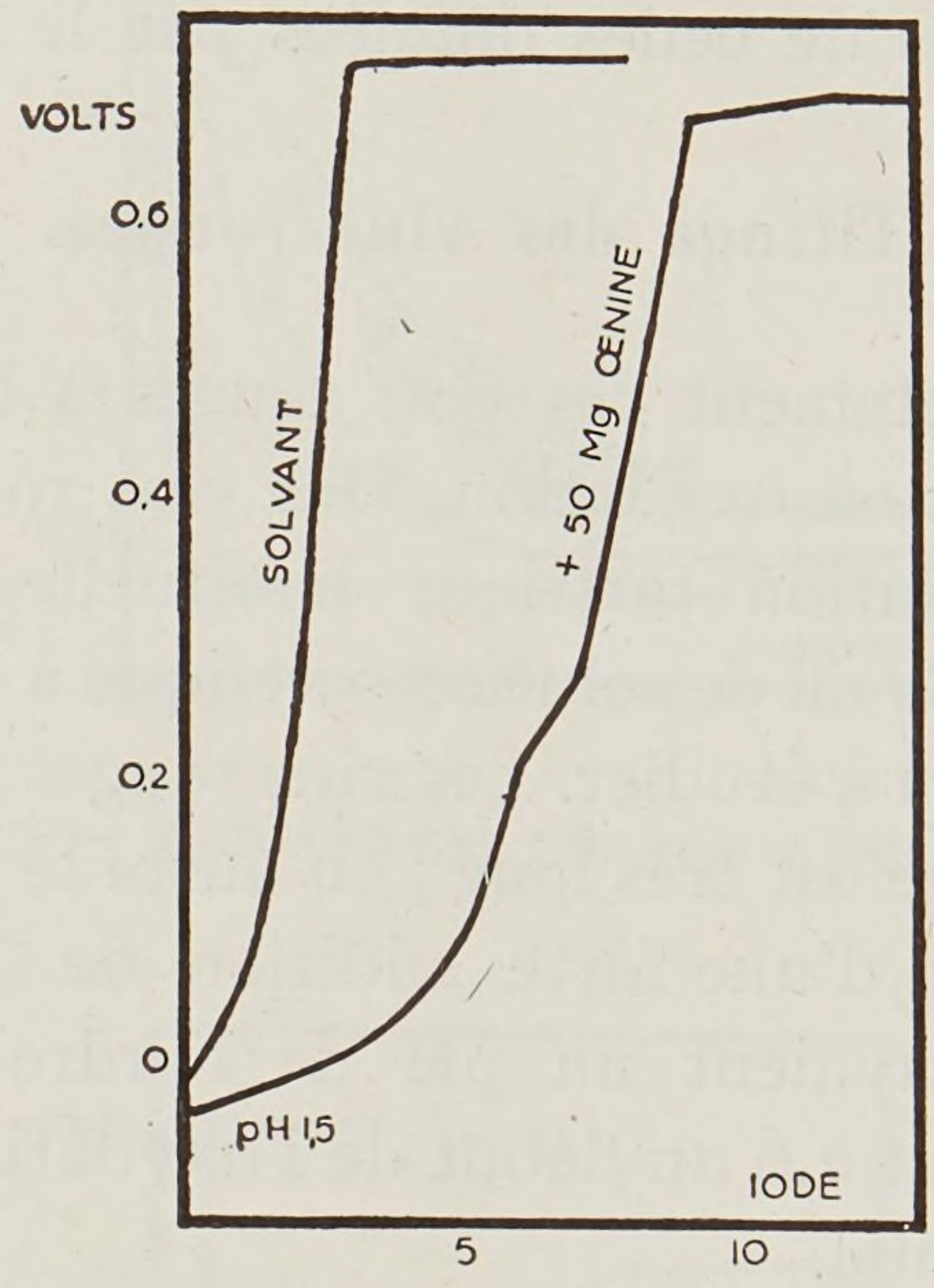


FIG. 17. — Oxydation de l'œnine par l'iode.

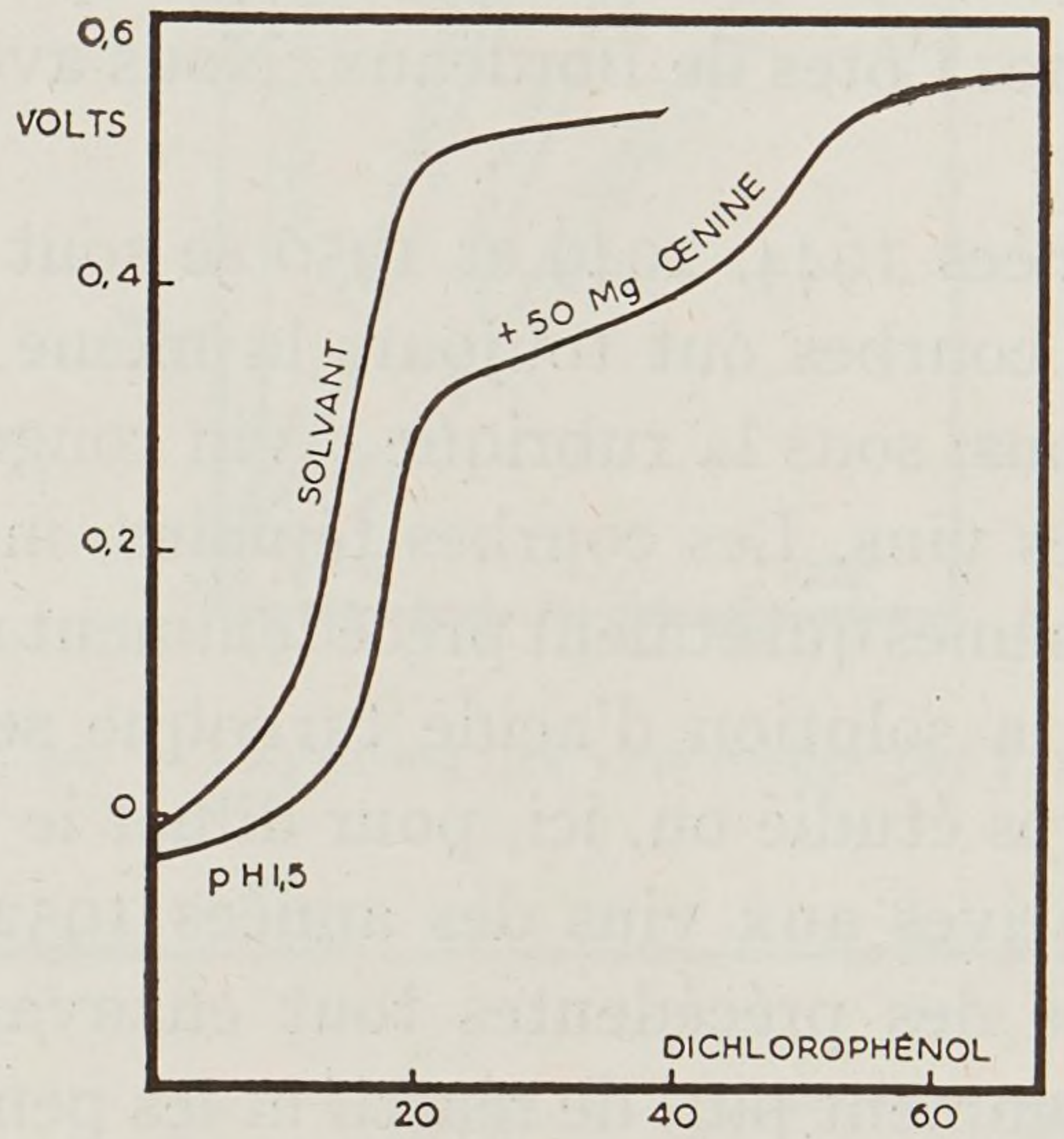


FIG. 18. — Oxydation de l'œnine par le dichlorophénolindophénol.

Ainsi l'œnoside donnant en oxydation et en réduction des points d'inflexion caractérisés et des paliers situés au même niveau, constitue un véritable système oxydo-réducteur réversible. Ce caractère nous paraît une notion nouvelle et importante.

En outre il ne paraît pas douteux que l'œnoside intervient dans les expériences du paragraphe précédent relatif aux solutions non purifiées d'anthocyannes.

On a enfin essayé, à la dose de 50 mg par litre, des anthocyannes à l'état de chlorures cristallisés, qu'avait bien voulu fournir au laboratoire

le Pr KARRER et on a trouvé avec l'œnoside un résultat semblable aux précédents obtenus avec le picrate d'œnine de Pascal RIBÉREAU-GAYON. Au contraire, avec l'œnidine ou malvidol, qui est l'aglucone, on observe un effet beaucoup moins sensible, les courbes en oxydation et en réduction étant très voisines de celles données par le solvant pur.

Titrage des vins rouges.

On a soumis directement des vins rouges à la même technique de titrage en réduction et en oxydation. Des vins rouges ont été dilués au cinquième avec la solution tartrique habituelle, c'est-à-dire que l'on plaçait dans le bécher 80 ml de solution tartrique à 5 g par litre et à pH 3,2 et en outre 20 ml du vin à étudier. Les vins rouges purs consomment trop de réactif et leur titrage est très long ; en outre le pH est trop fortement abaissé par la nécessité d'une forte addition de $TiCl_3$. Les vins dilués ainsi soumis à l'essai avaient un pH de l'ordre de 3,3 au début de la réduction par $TiCl_3$ et 2,6 au début de l'oxydation par l'iode ou par le dichlorophénolindophénol.

Nous avons ainsi essayé, au milieu de l'année 1955, quelques vins récoltés en diverses années et provenant presque tous d'une même propriété des Premières Côtes de Bordeaux. Nous avons obtenu les résultats suivants :

Les vins des années 1944, 1949 et 1950 se sont comportés de façon assez semblable ; les courbes ont toujours la même allure et sont assez voisines. Nous donnons, sous la rubrique « Vin rouge vieux » les courbes relatives à l'un de ces vins. Les courbes témoins, marquées ici « Liqueur de dilution » sont les mêmes qui étaient précédemment marquées « Solvant » ; il s'agit toujours de la solution d'acide tartrique seule qui est utilisée pour dissoudre le corps étudié ou, ici, pour diluer le vin étudié.

Les courbes relatives aux vins des années 1952, 1953 et 1954 sont nettement différentes des précédentes tout en ayant un peu la même forme. Ces vins consomment plus de réactif et les pentes sont plus faibles. Mais ces trois vins plus jeunes se sont comportés d'une manière assez semblable entre eux, et nous donnons sous la rubrique « Vin rouge », les courbes relatives à l'un d'eux.

Dans une expérience de vinification, ce vin avait été élaboré de deux manières : *a*) en enlevant la rafle ; *b*) en laissant la rafle en contact avec le jus dans la cuve de fermentation. Le comportement de ce dernier vin est nettement différent ; la courbe est plus allongée ; le liquide consomme plus de réducteur ou plus d'oxydant pour être amené à un potentiel déterminé. C'est là évidemment un effet des polyphénols extraits de la rafle par le jus en fermentation qui est chaud, acide et alcoolisé.

D'autres facteurs n'ont pas montré d'influence déterminée, par exem-

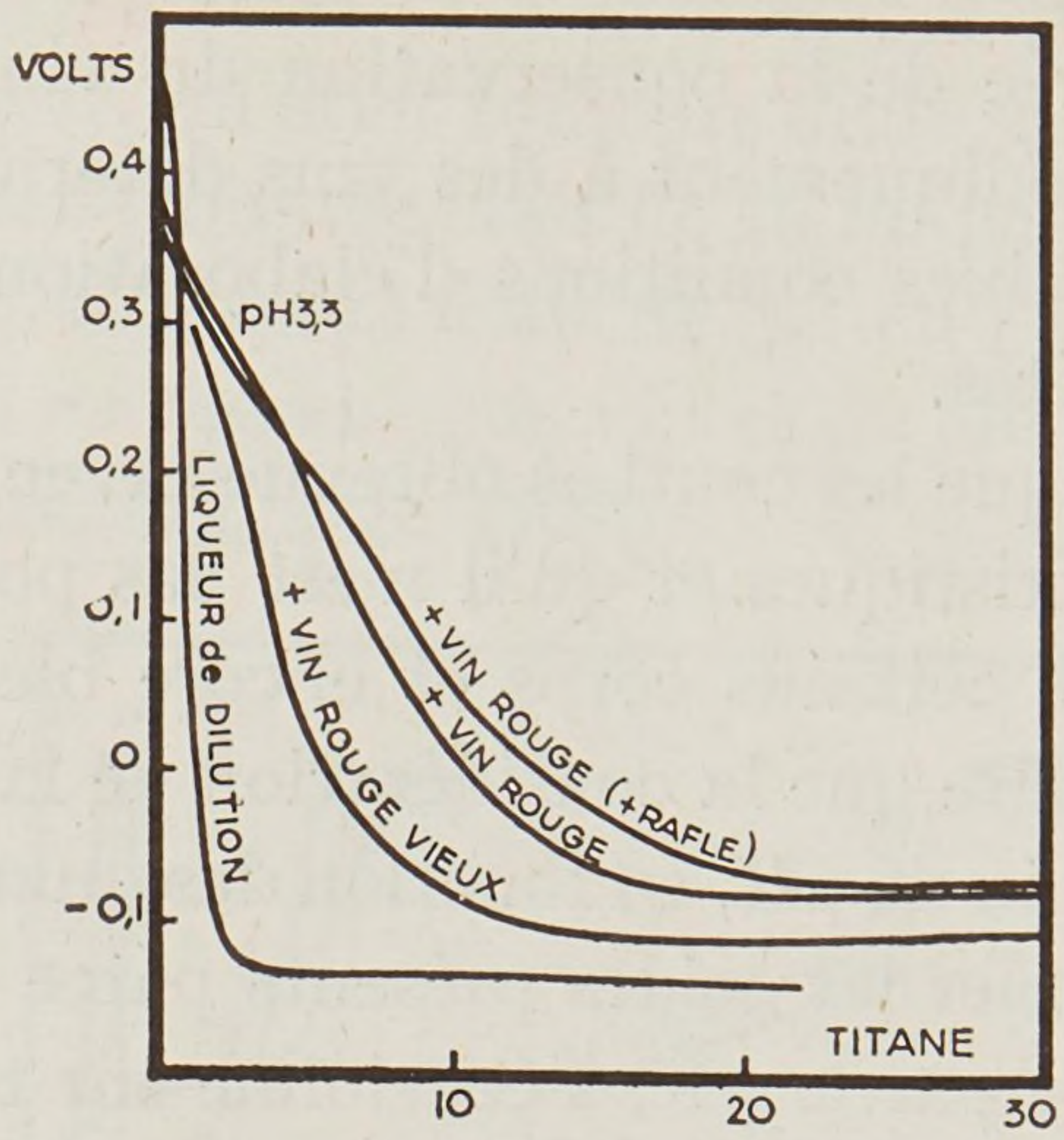


FIG. 19. — Réduction des vins rouges par $TiCl_3$.

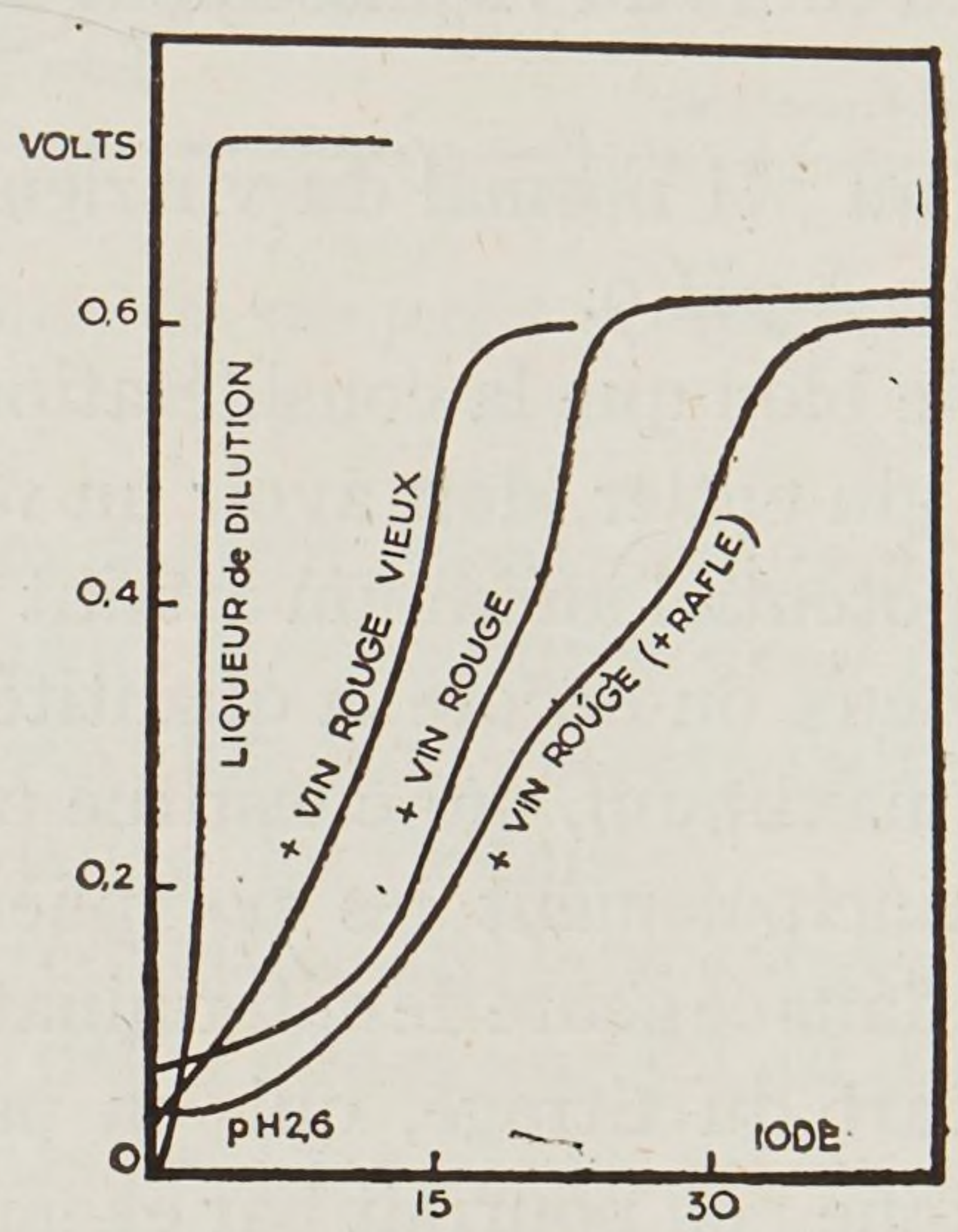


FIG. 20. — Oxydation des vins rouges par l'iode.

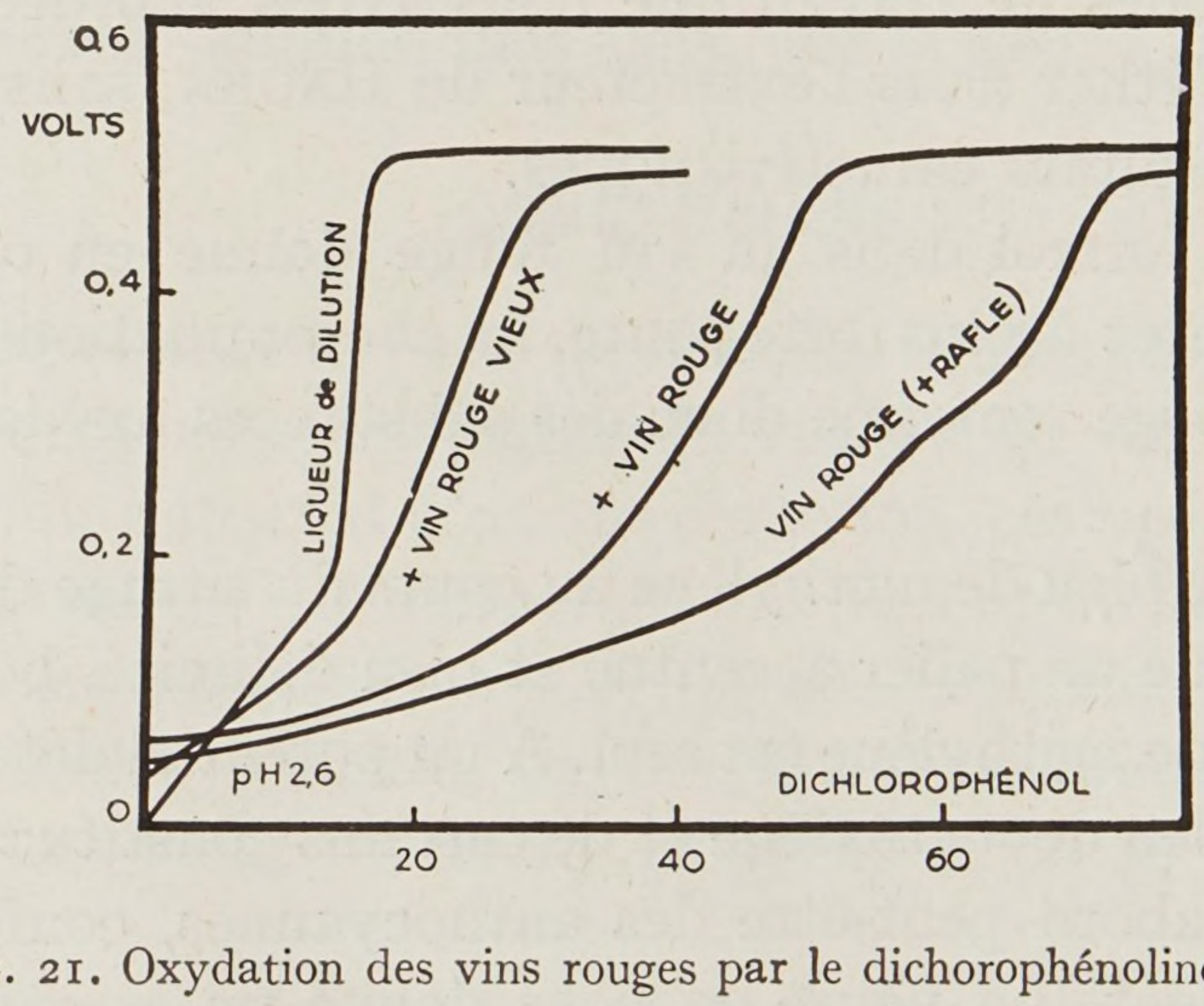


FIG. 21. Oxydation des vins rouges par le dichorophénolindophénol.

ple l'acidité du vin, non l'acidité au moment du titrage, mais l'acidité pendant toute la durée de la conservation du vin. Il reste à appliquer cette technique méthodiquement à des vins déterminés et différents par leur origine, par certaines conditions d'élaboration ou de traitement ou par certaines propriétés.

Il faut constater que les courbes obtenues avec les vins ne présentent pas de paliers caractéristiques et qu'il n'est pas possible de déceler dans un vin la présence de certains corps et encore bien moins de les doser. Ceci de la même manière que la considération de la courbe de neutralisation d'un vin, ou chemin de pH, en fonction des quantités d'alcali ajoutées ne permet pas de déceler les acides présents parce que leur constance de dissociation, exprimée par le pK, s'échelonne sur toute l'échelle des pH, de telle sorte que les courbes ne présentent pas d'inflexions et de paliers caractérisés. Nous ne sommes d'ailleurs pas surpris de ne pas retrouver le palier de l'œnine qui au cours du vieillissement du vin subit une condensation progressive (7).

On n'observe donc au pH normal du vin rien de semblable aux résultats observés par GELOSO à pH 9.

Cependant, il semble bien que la considération de ces courbes, obtenues directement sur le vin entier, doit avoir un réel intérêt pour l'étude des vins, notamment le potentiel minimum atteint en réduction qui paraît plus bas pour les vins vieux ou encore la quantité d'oxydant permettant d'atteindre le potentiel maximum, qui constitue un dosage d'une somme de corps oxydables, principalement les polyphénols (tanins et anthocyannes). Bien entendu, dans ce genre de détermination, il faut définir exactement le point de départ du titrage, qui, en particulier, ne doit pas comporter d'excès de titane ; on pourrait par exemple ajouter un colorant dont le potentiel serait voisin de 0.

Enfin, on effectuera, à partir de différents vins, des fractionnements par diverses méthodes de travail que nous avons abordées en traitant un vin rouge par l'éther dans l'extracteur de HAGEN, sans avoir obtenu actuellement de résultats caractéristiques.

L'addition de formol dans un vin rouge donne en oxydation une courbe plus courte et à plus forte pente. La consommation d'oxydant est moindre. Le vin rouge renferme donc des substances oxydables bloquées par le formol.

La présence de bleu de méthylène au cours du titrage des vins rouges par oxydation donne un palier accentué et bien délimité, beaucoup plus long que si le bleu de méthylène est seul. A un potentiel déterminé s'ajoutent les effets du bleu de méthylène et de certains constituants oxydables du vin, et tout d'abord peut-être des anthocyannes, conformément au paragraphe précédent. La figure 22 nous donne un exemple et montre sinon des paliers horizontaux, du moins des éléments de courbe à pente

beaucoup plus réduite et assez bien délimités à leurs deux extrémités. Dans cette expérience, le vin était toujours dilué au cinquième, la quantité de bleu de méthylène ajoutée était de 10 ml par litre d'une solution à 4,7 g par litre. Le pH au départ était de 3,1 en l'absence de vin, 2,5 en présence de vin et 2,0 en présence de vin et de bleu de méthylène (dont la présence a exigé davantage de $TiCl_3$).

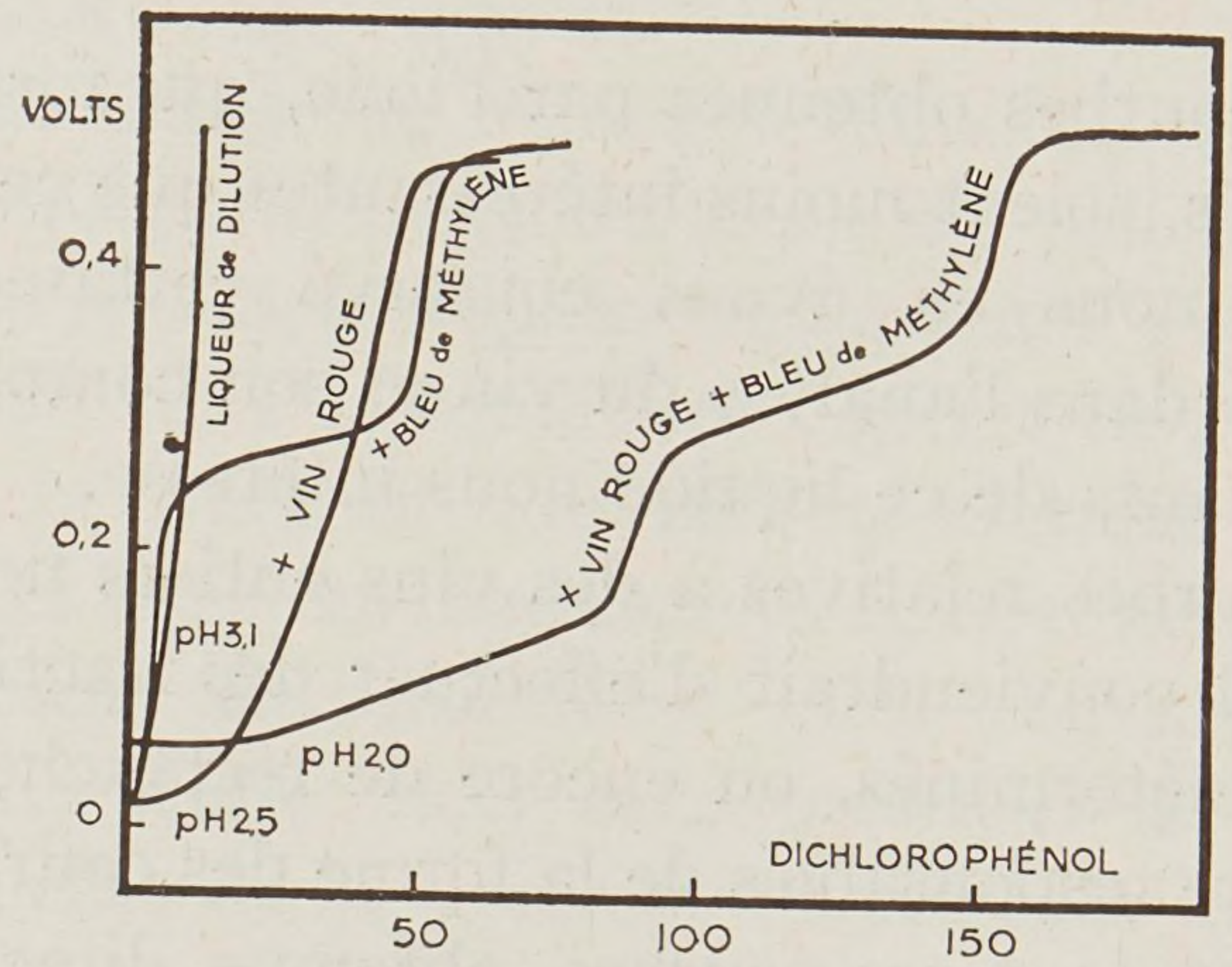


FIG. 22. — Oxydation des vins rouges en présence de bleu de méthylène.

Ces courbes nous paraissent intéressantes. La différence de longueur des deux paliers, qui peut être mesurée avec une certaine précision et comparée entre différents vins, doit correspondre à la présence d'un certain groupe de corps oxydables définis.

Dans le cas de la réduction des vins rouges, la présence de bleu de méthylène ne donne de palier défini que s'il est à un taux élevé, beaucoup plus élevé que dans le cas des vins blancs ou des solutions de tanin. Sinon les courbes sont étirées et la présence de ce colorant au niveau de son potentiel normal est à peine dessinée. Le bleu de méthylène au lieu d'imposer son potentiel normal, subit l'effet des constituants réductibles du vin qui ont un pouvoir tampon plus élevé que le sien.

CONCLUSIONS

L'objet de ce travail était de réduire ou d'oxyder, à l'aide de solutions titrées, certains constituants du vin, ou du vin entier, et de suivre les variations du potentiel d'oxydo-réduction, ces opérations étant effectuées au voisinage du pH normal du vin (de l'ordre de 3) et dans la zone habituelle de son potentiel (0 à 0,5 *v*). On est dans ces conditions plus assuré de saisir les systèmes oxydo-réducteurs éventuellement présents dans le vin dans l'état où ils s'y trouvent et où ils réagissent dans ce liquide.

Nous décrivons d'abord la technique que nous avons été amenés à utiliser pour des raisons que nous précisons. Cette technique permet aisé-

ment de caractériser un système oxydo-réducteur comme le bleu de méthylène et de le doser. Si donc le vin renferme un corps oxydo-réducteur analogue au bleu de méthylène, il doit être possible de le caractériser et peut-être de le doser, s'il est en quantité suffisante et s'il réagit seul dans une certaine zone de potentiel, de manière à ce que le palier de la courbe de titrage et les points équivalents correspondants soient suffisamment distincts.

Bien que les courbes obtenues par l'iode, qui forme des complexes avec les polyphénols, soient moins intéressantes que celles obtenues avec le dichlorophénol, nous en avons conservé certaines, car l'iode est couramment utilisé dans l'analyse du vin et son comportement vis-à-vis des divers constituants de ce liquide nous intéresse.

En fait les courbes relatives à des vins entiers ne présentent pas de paliers distincts. Il conviendrait d'effectuer des fractionnements ou des blocages de corps déterminés, ou encore de rechercher les constituants du vin pouvant être responsables de la forme des courbes.

Mais dès maintenant ces courbes, obtenues directement sur le vin, présentent un réel intérêt pour l'étude de ce liquide, car elles diffèrent selon le type de vin et les traitements subis. On peut déterminer pour un vin un pouvoir oxydant total ou un pouvoir réducteur total entre deux potentiels et les considérations des courbes doivent permettre de choisir correctement ces potentiels. On peut envisager ainsi un dosage d'une somme de corps, particulièrement en opérant en présence de bleu de méthylène. En outre, ces courbes permettent de constater l'absence dans le vin de substances telles que l'acide ascorbique, du moins à dose notable.

D'autre part, le potentiel minimum atteint en réduction est plus bas dans le cas des vins vieux. Ce fait mériterait une étude plus complète, car il est connu que l'apparition des substances odorantes dans les vins fins à l'abri de l'air, en bouteilles, qui constituent le « bouquet », est d'autant plus rapide et complète que le potentiel limite atteint est plus faible, comme si ces substances existaient sous deux formes, oxydée et réduite, la forme réduite étant seule odorante.

Si maintenant on met en œuvre les mêmes techniques, non plus sur du vin, mais sur une macération alcoolique et acide de pellicules de raisins rouges, riches en polyphénols (tanins et anthocyannes), on constate que ces substances réagissent au chlorure de titane et commencent à être réduites à des potentiels relativement élevés, qui sont de l'ordre des potentiels atteints par les vins normalement aérés au cours de leur conservation, soit 0,3 à 0,4 *v*. De même ces polyphénols, préalablement réduits, réagissent au dichlorophénolindophénol et commencent à être oxydés à des potentiels relativement bas, qui sont de l'ordre des potentiels atteints par les vins conservés complètement à l'abri de l'air, soit 0 à 0,1 *v*.

On peut donc prévoir que les oscillations normales des conditions

d'aération d'un vin au cours de sa conservation et de ses traitements, et par conséquent les oscillations normales de son potentiel d'oxydo-réduction, entraînent aussitôt des modifications chimiques dans la structure des polyphénols. Ces corps s'oxydent ou se réduisent aussitôt par le seul jeu des variations normales de potentiel, voire même commandent ces variations. A ces modifications doivent correspondre des variations de propriétés et sans doute de goût.

Les courbes de titrage en réduction d'une macération de pellicules de raisins rouges présentent un palier très net à 0,26 *v* à pH 3. Les courbes de titrage par le dichlorophénolindophénol présentent ce même palier, au même niveau, à la condition d'opérer en présence de bleu de méthylène. Si non le palier est à un niveau inférieur ou mal défini. Les substances présentes dans ces macérations se comporteraient comme des substances faiblement électroactives ; elles constitueraient bien des systèmes oxydo-réducteurs, mais sans présenter de potentiel normal défini, à moins qu'elles ne se trouvent en présence de substances fortement électroactives, comme un colorant d'oxydo-réduction qui active la transformation redox du premier système.

Par contre, l'œnoside en solution pure constitue, même en l'absence de catalyseur, un véritable système oxydo-réducteur réversible dont le potentiel normal se trouve voisin de celui du bleu de méthylène, soit environ 0,3 *v* à pH 2,5. C'est une notion qui nous semble nouvelle et importante.

Les corps électroactifs sont oxydables par l'oxygène moléculaire dissous dans le liquide, sont autoxydables. Les corps faiblement électroactifs le sont également, mais à des degrés moindres et moins qu'en présence des premiers. La considération de ces faits doit éclairer ce qui se passe lorsqu'un vin a dissous de l'oxygène et lorsque, ce vin étant remis à l'abris de l'air, l'oxygène dissous disparaît. Elle doit éclairer l'étude des systèmes oxydo-réducteurs de GELOSO et des « oxydants intermédiaires » de RIBÉREAU-GAYON, de leur nature et de leur fonctionnement.

Sans pouvoir affirmer que les polyphénols, les anthocyannes en particulier, sont des constituants de ces systèmes, il semble qu'en tout cas ces substances doivent conditionner leur fonctionnement. Intervenant dans des réactions de transferts d'hydrogène elles sont intéressantes à un double point de vue, par leur modification même et par les modifications qu'entraînent pour d'autres constituants du vin ces transferts d'hydrogène. Il est même possible que suivant les cas elles présentent sur la fixation de l'oxygène par le vin, soit un effet catalyseur lié à leur propriété de transporteur d'hydrogène, soit un effet antioxygène lié à leur pouvoir tampon élevé vis-à-vis des variations de potentiel.

La considération de ces faits doit éclairer le problème difficile du vieillissement du vin, de la nature des transformations subies, de leurs

conditions, et éventuellement de leur obtention plus rapide. Il faudra tenir compte d'ailleurs de ce que pendant le vieillissement les anthocyannes subissent une condensation (7) qui nécessairement modifie profondément leurs propriétés oxydo-réductrices et on comprend que les courbes relatives aux vins plus ou moins âgés, ne présentent pas d'inflexions, qui correspondraient aux anthocyannes.

Il est bien entendu que ce travail d'ordre expérimental, dont l'objet était de rechercher ce que dans l'étude du raisin et du vin on peut attendre du titrage potentiométrique, laisse entièrement de côté la nature des transformations chimiques subies par les tanins ou les anthocyannes au cours de leur réduction et de leur oxydation, étude qui présenterait d'ailleurs un grand intérêt pour l'œnologie.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) GELOSO (J.). — *Ann. Brass. et Distil.*, **29**, 177, 193, 257 et 273, 1953.

(2) WURMSER (R.) et GELOSO (J.). — *J. Chim. Phys.*, **26**, 447, 1929.

(3) DE ALMEIDA (H.). — *Ann. Inst. Vinho do Porto*, 1951 et 1952. CREFF (R.) et JACQUIN (P.). — *Ann. Tech. agric.*, **4**, 141, 1955. DEIBNER (L.). — *Ann. Tech. agric.*, **1**, 345, 1952. *Rev. Ferment. et Ind. alim.*, **8**, 7 et 47, 1953. *Ann. Falsif.*, **46**, 411, 1953. P. FICI. — *Riv. Viticolt. et Enol.*, 1953. GARINO CANINA (E.). — *Ann. Staz. Enol. Asti*, **11**, 23, 1935-37. GENEVOIS (L.) et NICOLAIEFF (T.). — *C. R. Soc. Biol.*, **125**,, 179, 1933. GRAFF (J.). — *Ann. Nut. et Alim.*, **4**, 253, 1950. JOSLYN (M. A.). — *Ind. and Engin. Chem.*, 1949. KEPES (A.). — *Chim. et Ind.*, **72**, 26, 1954. KOCH (J.). — *Americ. J. of Enology*, **6**, 23, 1955. MARECA-CORTES (I.). — *Cons. sup. Investig. cientif.* (Sec. Ferm. indus.), Madrid, 1954. PATRON (A.). — *Ann. Inst. fruits et agrumes*, 1953. RENTSCHLER (R.) et TANNER (T.). — *Travaux de Chimie alimentaire*, **43**, 294, 1952.

(4) RIBEREAU-GAYON (J.). — *P. V. Soc. Sc. Phys. Nat. Bordeaux*, 59, 1928-29 ; 37, 1930-31. *Oxydations et réductions dans les vins*, Thèse Bordeaux, 1931 et Delmas, Bordeaux, 1933. *Bull. Soc. Chim. France*, **53** (4), 209, 1933. *Chim. et Ind.*, **68**, 97, 1952 et *Cong. Intern. Vin.*, Rome, sept. 1953.

(6) TCHOGOVADZE, cité par DEIBNER (L.). — *Ann. Tech. agric.*, **1**, 345, 1952 et *Rev. des Ferment.*, **8**, 7 et 47, 1953.

(7) GENEVOIS (L.) et RIBEREAU-GAYON (J.). — *Le Vin*, Hermann, Paris, 1947.

(8) BARAUD (J.). — *Bull. Soc. Chim.*, **18**, 837, 1951 ; 20, 521 et 525, 1953.

(9) RIBEREAU-GAYON (P.). — *Les anthocyannes du raisin*. Diplôme d'études supérieures, Bordeaux 1954, RIBEREAU-GAYON (J. et P.). — *C. R. Ac. Sc.*, **238**, 2114 et 2188, 1954.

(10) RIBEREAU-GAYON (J.) et GARDRAT (J.). — *Soc. Chim. France* (Section de Bordeaux), 10 juillet 1956 et *C. R. Ac. Sc.*, **243**, 788, 1956.

LES ACETOBACTER DU VIN
IDENTIFICATION DE QUELQUES SOUCHES

PAR

P. DUPUY

Station de Technologie Végétale, Versailles. (1)

PLAN DU MÉMOIRE

Introduction.

I. — Espèces déjà rencontrées dans le vin.

II. — Classification des *Acetobacter*.
Étude critique des tests proposés.
Nouveaux tests.

III. — Identification des souches personnelles.
Discussion.

IV. — Conservation des souches.
— par lyophilisation,
— sous huile.

Conclusion.
Sur la classification.
Sur les espèces présentes dans le vin.

INTRODUCTION

La classification des *Acetobacter* proposée par Frateur (1), rendait possible une étude systématique des espèces qui se rencontrent dans les vins. Nous avons déjà indiqué les méthodes d'isolement (2). Le présent travail constitue l'application de ces techniques aux *Acetobacter* du vin. Il fournit aussi l'occasion de comparer les espèces déjà décrites avec celles que nous avons personnellement isolées et déterminées. Il permet en outre d'apprécier la valeur pratique de la nouvelle classification.

I. — ESPÈCES DÉJA RENCONTRÉES DANS LE VIN

Pasteur a été le premier à isoler des ferments acétiques (1868). Dans son mémoire sur la fermentation acétique (3), il dit avoir cultivé

(1) Travail effectué à la Station centrale de Technologie des produits végétaux, Narbonne.

sur du vin additionné de vinaigre, le ferment acétique dont il donne la description.

Cet organisme correspond-il à *A. aceti* Beijerinck ? FRATEUR prétend que oui, puisque l'espèce décrite par PASTEUR suroxyde l'acide acétique, pousse sur milieu minéral en présence d'alcool et d'acide acétique, et s'en rapproche par sa morphologie.

Nous ferons remarquer que PASTEUR pensait qu'il existait une seule espèce de ferments acétiques qui, dans certaines circonstances, pouvait prendre la forme de phytoglées analogues à celles des moisissures. Il est donc possible que les caractères rapportés dans son mémoire se rapportent à deux espèces différentes. Le fait que nous n'ayons pas retrouvé cette espèce dans le vin, doit faire penser que l'espèce décrite par PASTEUR a été isolée à partir de vinaigre et non à partir de vin.

HENNEBERG (4), puis LAFAR (5) ont décrit sous le nom de Weinessigbakterien un certain nombre de bactéries acétiques. On ne sait pas si ces organismes ont été isolés du vin ou du vinaigre de vin. La dénomination employée est ambiguë et peut aussi bien signifier : bactéries acétiques du vin, que bactéries du vinaigre de vin.

Les espèces décrites dans cette rubrique sont donc celles qu'on a isolées du vin et du vinaigre de vin. Rien ne nous dit à priori que ce soient les mêmes.

Ces auteurs ont décrit les espèces suivantes :

1° *Bacterium ascendens* Henneberg — aujourd'hui *Acetobacter ascendens* Henneberg. Cette espèce a été retrouvée au cours de nos isolements.

2° *Bacterium vini acetati* Henneberg — aujourd'hui identifié par FRATEUR à *Acetobacter rancens* var. *vini* Beijerinck. Nous avons retrouvé cette espèce dans le vin.

3° *Bacterium orleanense* Henneberg — cette souche a été classée par FRATEUR comme *Acetobacter mesoxydans* var. *lentum* Frateur. Nous l'avons aussi retrouvée dans le vin.

Le caractère qui avait amené HENNEBERG à faire une espèce distincte de cette souche est la consistance particulière du voile. Cette propriété a été perdue, d'après FRATEUR, par la souche conservée en collection.

La consistance du voile étant fortement modifiée par la teneur du milieu en glucose, glycérine et tanins, l'existence de cette espèce n'est donc pas certaine.

4° *Bacterium xylinoïdes* identifié par FRATEUR à *A. xylinum* var. *xylinoïdes* (Beijerinck) Frateur, n'a pas été rencontré dans le vin alors que ses caractères très particuliers ne pouvaient pas faire qu'il passe inaperçu.

5° *Bacterium xylinum* Brown — dénommé d'après FRATEUR *Ace-*

tobacter xylinum (Brown) Beijerinck — n'a pas été rencontré dans le vin.

En 1906 FUHRMANN (6) isole du vin une souche dénommée par lui *Acetobacter plicatum*. L'absence de caractères biochimiques ne permet pas de classer cette espèce.

En 1933 COZIC (7) ne réussit pas à se procurer de souche d'*A. xylinum* à partir du vin, ce qui confirme nos résultats.

En 1935 QUERE (8) décrit un ferment acétique isolé d'un vin rouge de Bordeaux qu'il désigne sous le nom de *B. Bordeaux*, déjà employé pour la même souche par NEUBERG et SIMON (9).

Le fait que cette souche n'oxyde ni le glucose, ni la glycérine, qu'elle suroxyde l'acide acétique, ainsi que la description morphologique donnée par l'auteur, permettent de supposer qu'il s'agit de *Acetobacter ascendens* (Henneberg) Bergey et Al.

Il existe dans la collection de FRATEUR une souche isolée d'un vin en voie d'acidification. Ne correspondant à aucune espèce décrite, elle a été dénommée *Acetobacter paradoxum* Frateur. Nous l'avons retrouvée plusieurs fois dans le vin.

En 1952 MARCELLI (10) a donné la description de 23 souches de ferments acétiques sans préciser leur provenance, nous ne pouvons donc les prendre en considération pour les comparer aux nôtres.

II. — CLASSIFICATION DES ACETOBACTER

Plusieurs classifications ont été proposées pour le genre *Acetobacter*. Après un essai de LAFAR en 1911 qui n'offre qu'un intérêt historique, WISSERT HOOFT (1925) (11) donne une classification basée sur les caractères biochimiques : présence de catalase, assimilation de l'azote ammoniacal, oxydation du glucose, oxydation et suroxydation de l'alcool.

JORGENSEN (12) a fondé sa classification sur les caractères morphologiques et les caractères pratiques suivants : aspect du voile, trouble du liquide, formes d'involution, mobilité, résistance à l'alcool, quantité maxima d'acide acétique formé. Cette classification, intéressante pour la vinaigrerie, s'appuie sur des caractères beaucoup trop imprécis ; on ne peut guère l'utiliser.

MARCELLI (10) a classé ses souches suivant la classification de JORGENSEN et celle de WISSERT HOOFT, il a constaté que la même souche pouvait être rangée dans deux espèces différentes suivant qu'on adoptait l'une ou l'autre des classifications.

La classification proposée par VAUGHN dans le *Manuel of determinative Bacteriology*, apporte un peu d'ordre dans un domaine bien confus où l'on n'a pas pratiqué les mêmes tests sur les diverses espèces.

ASAI (19) donne à plusieurs reprises une classification des bactéries oxydantes, mais il n'a pas indiqué de subdivision du genre *Acetobacter*.

Cette classification reste cependant intéressante, car elle délimite une frontière nette entre les *Pseudomonas* et les bactéries oxydantes qu'elle divise en deux genres : *Acetobacter* et *Gluconobacter*, suivant qu'ils oxydent plus facilement l'alcool ou le glucose. Cette classification, quoique très logique, ne donne pas la place des espèces depuis longtemps isolées.

En 1950, Frateur (1) publiait un « Essai sur la systématique des Acetobacters » qui apportait une solution à l'identification de ces micro-organismes.

L'auteur a réuni les souches qui se trouvaient éparses dans diverses collections. Il a ainsi retrouvé un grand nombre des souches ayant servi à la description originale des espèces. Toutes ces souches ont été soumises à certains tests dans des conditions bien déterminées.

Ce travail fournit un cadre rigide à la classification de tous les ferments acétiques et donne à chacune des souches historiques une position non équivoque.

Plusieurs espèces ont été réunies ; certaines autres décrites sous des noms différents ont été trouvées identiques, enfin des modifications ont été apportées dans la dénomination. C'est à cette classification que nous nous sommes référés pour l'identification de nos souches.

ÉTUDE CRITIQUE DES TESTS PROPOSÉS

a) La réaction de la catalase.

Ce test est effectué avec une culture ayant poussé sur eau de levure gélosée à 10 p. 100 de glucose et 3 p. 100 de CO_3Ca. On l'effectue en recouvrant d'eau oxygénée à 3 volumes, les bactéries transportées sur une lamelle de verre.

Lorsque la souche est catalase positive on voit se dégager des bulles d'oxygène. Nous n'avons jamais eu besoin de porter la lame sous un microscope comme il est conseillé lorsque la réaction est faible. Ce test est fidèle et il n'a jamais présenté d'irrégularité ou de difficulté.

b) Le métabolisme de l'alcool et de l'acide acétique.

On peut effectuer ce test en faisant une culture sur eau de levure gélosée à 3 p. 100 d'alcool et 2 p. 100 de CO_3Ca. La production d'acide acétique se remarque par la dissolution du carbonate de calcium qui se transforme en acétate de calcium et CO_2.

La suroxydation de l'acétate s'observe par une nouvelle précipitation de CO_3Ca. Le plus souvent cette précipitation se produit à la surface de la gélose et donne lieu à une irisation.

La première phase du phénomène est toujours facilement obser-

vable ; mais la seconde est parfois douteuse. Nous pensons que le gaz carbonique qui se dégage pendant toute la culture peut créer des conditions d'anaérobiose qui empêchent la seconde phase de suroxydation de l'acide acétique. Nous n'avons jamais admis ce test comme négatif sans l'avoir confirmé par la méthode suivante indiquée aussi par FRATEUR :

On ensemence la souche étudiée dans une fiole de Fourneau de 250 ml. contenant 50 ml. d'eau de levure et 1 ml. d'alcool éthylique. Tout au cours de la culture, on suit à la soude 0,1 N les variations de l'acidité totale sur des prises d'essai de 1 ml.

Avec les souches oxydant l'acide acétique, on enregistre en fin de culture des diminutions de l'acidité. Comme le montrent les quelques exemples que nous donnons la disparition de l'acide acétique ne va jamais bien loin.

Les travaux de FEDERICO et ANTONIANI (13) ont montré que l'addition à un milieu de l'un des acides du cycle de Krebs augmente la vitesse de suroxydation de l'acide acétique, aussi avons-nous modifié la technique proposée par FRATEUR en additionnant le milieu à l'eau de levure de 0,2 p. 100 de succinate de Na. On arrive ainsi à produire la suroxydation de l'acide acétique alors que l'expérience sans succinate ne l'avait pas décelée (tableaux I et II).

TABLEAU I

Oxydation et suroxydation de l'alcool par la souche AB2.

Temps	ml. de NaOH 0,1 N pour neutraliser 1 ml. de culture	
	sans succinate	avec succinnate
3 jours	0,05	
4 jours	0,77	
6 jours	2,17	
7 jours		1,85
8 jours	2,40	
10 jours		0,90
11 jours	2,35	
14 jours	2,37	
17 jours		0,70
18 jours	2,39	0,70

L'interprétation de ce test est celle qui nous paraît la plus difficile et la moins sûre.

La méthode de culture sur milieu liquide modifiée comme nous l'avons décrit, est celle qui nous a donné les meilleurs résultats. Nous pensons cependant qu'elle pourrait être encore améliorée en tamponnant le milieu avec des phosphates.

En effet, WIAME et LAMBION (14) ont remarqué que si la croissance se fait à pH 3,8 (acétification non contrôlée), les bactéries sont presque incapables de suroxyder l'acide acétique à pH 5,6. Si la croissance a lieu

TABLEAU II

Oxydation et suroxydation de l'alcool par la souche AB12.

Temps	ml. de NaOH 0,1 N pour neutraliser 1 ml. de culture	
	sans succinate	avec succinate
2 jours	0,03	
4 jours	0,63	
6 jours	0,06	
7 jours		0,25
8 jours	0,10	
10 jours		1,35
11 jours	0,74	
14 jours	1,78	0,35
18 jours	1,88	0,35

à pH 5, l'acide acétique est alors oxydé. Le pH 7 n'est pas le pH optimum de cette réaction, on n'a donc pas intérêt à utiliser du CO_3Ca pour tamponner le milieu.

Une dernière difficulté subsiste pour les microorganismes qui forment difficilement un voile sur milieu liquide, en particulier ceux du groupe suboxydans. Cette difficulté pourrait être résolue par l'emploi de cultures agitées.

Compte tenu de ces diverses remarques, le mode opératoire que nous proposerions serait le suivant :

On ensemence la souche à étudier prélevée sur un milieu solide dans le milieu stérile suivant :

Eau de levure	1 l.
Acide succinique	2 g.
PO_4KH_2	5 g.
neutralisé à pH 7 avec NaOH pur.	

Le test peut se faire dans les fioles de Fourneau de 250 ml contenant 50 ml de milieu, auquel on ajoute, avant l'utilisation 1 p. 100 d'alcool éthylique pur. On fait alors une culture agitée. L'acidité est suivie par des dosages d'acidité volatile effectués après entraînement à la vapeur d'eau de 2 ml. de milieu préalablement acidifiés. Nous pensons que cette méthode devrait être utilisée chaque fois que les tests habituels n'ont pas été positifs.

Par suite des modifications que cette nouvelle méthode serait susceptible de produire dans la classification de FRATEUR, nous nous sommes tenus à celles utilisées par cet auteur lorsque nous avons procédé à l'identification des souches.

c) **Le métabolisme de l'acide lactique.**

Cette propriété est mise en évidence par la culture sur eau de levure gélosée, à 2 p. 100 de lactate de Ca. L'oxydation du lactate produit une

précipitation de CO_3Ca autour de la culture. On peut aussi la mettre en évidence en s'affranchissant du phénomène de croissance par la technique des oxydogrammes décrite par FRATEUR (1). Le test permet en outre de déceler la production d'acétoïne. En recouvrant l'oxydogramme de liqueur de Fehling on voit apparaître à froid un précipité d'oxydule de cuivre allant du jaune au rouge-brique, lorsqu'il s'est formé de l'acétoïne.

Le test est fidèle et nous n'avons pas rencontré de difficultés dans sa mise en œuvre.

d) **Le pouvoir cétogène.**

Les tests proposés mettent en évidence l'oxydation des fonctions alcools secondaires en cétones. La méthode des oxydogrammes convient parfaitement. On dispose un amas de microbes sur une boîte de Pétri contenant : eau de levure gélosée 2 p. 100, glycérine 2 p. 100. Après 2 à 10 heures de séjour à l'étuve à 28° on recouvre la gélose de liqueur de Fehling ; la dioxyacétone produite donne à froid un précipité d'oxydule de cuivre.

On teste aussi de la même façon la production de lévulose à partir de mannite. Dans ce cas, on révèle l'oxydogramme avec la liqueur de Fehling chauffée à 50°.

e) **L'oxydation du glucose en acide gluconique.**

Ce critère se met en évidence par culture en strie de la souche considérée sur eau de levure gélosée 2 p. 100, glucose 10 p. 100, CO_3Ca 3 p. 100.

La production d'acide gluconique se manifeste par une dissolution de CO_3Ca. Le gluconate est suroxydé par certaines espèces en 5 cetogluconate qui cristallise : c'est là une preuve du pouvoir cétogène de la souche. Au cours de l'oxydation du glucose, il peut se former des produits réduisant à froid la liqueur de Fehling.

f) **Assimilation de l'ammoniaque en présence d'alcool.**

Cette propriété est mise en évidence par la culture sur milieu de Hoyer, modifié par FRATEUR. Ce milieu est obtenu en mélangeant après stérilisation :

A. —	$SO_4(NH_4)_2$	1 g.
	$PO_4H\ K_2$	0,1
	PO_4H_2K	0,9
	SO_4Mg	0,25
	Eau distillée	1 l.
B. —	$Fe\ Cl_3$ à 1 p. 1000	5 ml.
C. —	Alcool éthylique à 95°	30 ml.

Aucune des souches que nous avons isolées, ne s'est développée sur ce milieu. Pour nous contrôler, nous avons vérifié que la souche L.40 *A. aceti* de la collection de Delft formait bien un voile sur ce milieu.

Comme l'a mis en évidence le travail de RAGHAVENDRA RAO et STOKES (20) plusieurs espèces d'*Acetobacter* ne peuvent se multiplier avec l'alcool éthylique comme seule source de carbone. Elles l'utilisent bien à la formation de leur matière vivante, mais à la condition qu'il existe dans le milieu de très faibles quantités d'hydrate de carbone. Ce fait avait déjà été signalé par PASTEUR (3) en 1868 pour *Mycoderma aceti* et par HOYER (21) en 1898 pour *A. aceti* Beijerinck. Ces deux organismes exigeaient pour se développer en milieu minéral la présence d'acétate ou d'acide acétique. En 1898 BEIJERINCK découvrait que A. *rancens* Beijerinck et *A. xylinum* (Brown) Beijerinck peuvent aussi pousser sur milieu minéral, à condition qu'il contienne des traces de glucose. L'assimilation de l'azote ammoniacal se trouve donc sous la dépendance de l'alimentation carbonée.

Il existe cependant des espèces qui peuvent se développer en milieu ammoniacal ne contenant que de l'alcool éthylique comme source de carbone. Ce sont : *A. peroxydans*, Wissert Hooft, *A. lovaniense* Frateur et *A. aceti* (Pasteur) Beijerinck.

Ces espèces sont peu nombreuses puisque sur les 67 souches examinées par FRATEUR elles n'apparaissent que cinq fois.

Il semble donc que FRATEUR ait eu raison d'éliminer l'acétate de sodium du milieu de Hoyer. Le sens du test devient alors beaucoup plus restrictif et il convient, pour ne pas créer de confusion, d'abandonner le nom de Hoyer pour le milieu minéral modifié par FRATEUR. Le test ainsi modifié sélectionne d'abord les microorganismes qui peuvent se développer sur l'alcool éthylique comme seule source de carbone et ensuite ceux qui peuvent se contenter d'un sel ammoniacal comme seule source d'azote. Il est donc normal que peu de souches réunissent ces deux propriétés.

NOUVEAUX TESTS

a) Oxydabilité du 2-3-butanediol.

Le pouvoir cétogène des *Acetobacter* nous a paru assez spécifique puisque nous avons trouvé des souches qui oxydent la glycérine en dioxyacétone sans oxyder la mannite en lévulose. Nous avons pensé qu'il pouvait y avoir intérêt à tester aussi l'oxydation du butanediol en acétoïne.

On a réalisé des essais comparatifs en ensemençant les diverses souches dans des tubes à essais contenant 20 ml. d'eau de levure à 2 p. 100 de substrat : glycérine ou butanediol. Après 8 jours d'étuve à 28°, le pouvoir réducteur est déterminé par la méthode de Bertrand et exprimé en grammes pour 100 ml. de dioxyacétone dans un cas, et d'acétoïne dans l'autre. Les mêmes souches ont été aussi testées pour l'oxydation du

glucose. La méthode adoptée a l'inconvénient de ne pas permettre de s'affranchir de la croissance. On sait en effet qu'il y a des souches incapables de proliférer sur un substrat et qui peuvent cependant l'oxyder (tableau III).

Tableau III

Production comparée de dioxyacétone et d'acétoïne par diverses espèces d'Acetobacter.

Souches étudiées	Oxydation		Dioxyacétone en g p. 100	Acétoïne en g p. 100
	du glucose	de la mannite		
A. xylinum maltosiferum souche L. 32 de Delft	+	+	0,69	0,32
A. aceti souche L. 40 de Delft	+	+	0,40	0,60
A. rancens souche L. 41 de Delft	+	—	o	0,89
A. xylinum var. *xylinoïdes* souche L. 1022 de Delft *	+	+		
A. orleanense souche L. 1376 de Delft *	+		o	0,23
A. ascendens souche L. 1466 de Delft *	—	—	o	o
Souches personnelles				
A. rancens AB. 1	+		o	1,15
A. paradoxum AB. 2	—		o	o
A. ascendens AB. 3	—		o	o
A. ascendens AB. 4	—		o	o
A. ascendens AB. 5	—		o	o
A. paradoxum AB. 6	±		o	0,30
A. suboxydans AB. 8	+		0,86	0,28
A. ascendens AB. 10	—		o	o
A. rancens AB. 11	+		o	0,21
A. mesoxydans AB. 14	+	+	0,03	1,66
A. paradoxum AB. 15	—		o	o
A. paradoxum AB. 16	—		o	o
A. rancens AB. 17	±		o	0,35
A. rancens AB. 18	±		o	0,13
A. rancens AB. 20	+		o	0,31
A. paradoxum AB. 21	—		o	0,22
A. mesoxydans AB. 23	+		o	1,6
A. paradoxum AB. 24	—		o	0,39

(*) Souches reçues de Henneberg.

Ce test montre que le butanediol peut servir à la croissance de certaines souches d'*Acetobacter* toujours aussi bien, et parfois mieux que le glucose. Notre expérience qui porte sur 26 souches permet d'avancer que toutes les souches qui oxydent le glucose, oxydent aussi le 2-3 butanediol. La réciproque n'est pas vraie puisque deux souches classées comme *A. paradoxum* oxydent bien le butanediol alors qu'elles n'oxydent pas le glucose.

L'oxydation du butanediol ne laisse jamais apparaître dans le milieu le diacétyle. Une partie est métabolisée et ne se retrouve pas sous forme d'acétoïne. Ainsi une culture sur eau de levure additionnée de butanediol

a donné, après 12 jours de culture en tubes à essais, les résultats suivants (tableau IV).

TABLEAU IV

*Utilisation de 2-3 butanediol par quelques souches d'*Acetobacter.

Souches	Teneur initiale en butanediol en mg. p. 100 ml	Après 12 jours teneur en :		
		Butanediol	Acétoïne	Acetoïne + butanediol
AB. 6	970	444	307	751
AB. 13	970	767	109	876
AB. 18	970	649	129	778
AB. 24	970	404	392	796
AB. 25	970	767	138	905

Le test de l'oxydation du butanediol paraît presque faire double emploi avec celui de l'oxydation du glucose. Il semble cependant, qu'il puisse permettre de différencier quelques souches qui n'oxydent pas le glucose. Il montre, d'autre part, que le pouvoir cétogène, transformation d'un alcool secondaire en cétone est plus largement répandu que ne le laisse prévoir la classification de FRATEUR.

Pour l'avenir, il sera prudent de remplacer le test dénommé pouvoir cétogène par une indication plus précise déterminant le substrat, par exemple oxydation de la glycérine ou de la mannite.

b) **Les colonies géantes.**

Elles ont déjà été utilisées par JANKE (15) puis par KULKA, PRESTON et WALKER (16). Ces derniers auteurs ont voulu s'en servir pour mettre en évidence la mobilité des espèces. Ils utilisent comme milieu de culture le moût de bière standard S. M. W. (17), contenant 0,7 p. 100 de gélose. Les espèces mobiles donnent une zone de diffusion visible par examen sur fond noir.

Ne pouvant disposer d'un éclairage sur fond noir, nous avons fait quelques colonies géantes sur S. M. W. gélosé à 2 p. 100 et réparti sur une hauteur de 1 cm. dans des boîtes de Pétri forme haute. Un ensemencement est réalisé au centre sans abimer la gélose et la culture est mise à l'étuve à 27° en atmosphère humide. Après 2 à 4 semaines, les colonies ont atteint habituellement 1 cm. de diamètre. Elles ont été examinées et photographiées en lumière incidente. Le dépouillement des résultats montre qu'il existe deux types de colonies :

— le premier de forme circulaire, à centre élevé, opaque, brillant, homogène, de consistance crémeuse ;

— le second de forme irrégulière, à bord découpés, opaque, plus terne, à surface rugueuse.

Dans les 20 colonies géantes que nous avons réalisées, il n'a pas été possible de déceler une relation avec les espèces. Il est bien plus probable que les deux aspects de colonies observées correspondent à des variations typiques.

c) La morphologie.

Des différences morphologiques peuvent apparaître surtout par formation de capsules. Leur apparition est conditionnée par l'emploi d'un milieu favorable. Plusieurs souches, fort différentes par leur place dans la classification, ont cependant le même aspect microscopique lorsqu'on les cultive sur du vin dans les mêmes conditions.

Les *Acetobacter* prennent alors une forme en huit qui est considérée comme caractéristique de ce genre par des œnologues depuis le dessin qu'en a donné PASTEUR. Il est donc absolument impossible de différencier par l'examen microscopique les divers *Acetobacter* contenus dans un vin.

III. — IDENTIFICATION DES SOUCHES PERSONNELLES

Les souches suivantes ont été isolées de vins du midi de la France. Les principaux caractères qui ont servi à leur classification sont rapportés dans le tableau V.

Discussion

A. paradoxum Frateur est une espèce très commune dans le vin puisque nous la retrouvons avec une fréquence de 32 p. 100. Cette espèce paraît bien homogène eu égard aux grands critères considérés. Seule la souche AB 21 n'a pas été capable de suroxyder l'acide acétique. Comme par ailleurs cette souche n'avait qu'une croissance très lente sur les milieux utilisés pour l'identification, il est difficile de la proposer comme une variété de type *A. paradoxum*.

A. ascendens (Henneberg) Bergey et Al., paraît constituer une espèce moins homogène. Elle représente 19 p. 100 des souches isolées. On a rangé sous cette dénomination quelques souches qui présentent la particularité de ne pas suroxyder l'acide acétique. Il semble que ce caractère se rencontre assez fréquemment pour justifier la création d'une variété dans l'espèce *A. ascendens*. A notre avis, une décision définitive ne pourra être prise à ce sujet qu'après une étude systématique des conditions d'oxydation de l'acide acétique par les *Acetobacter*. A la suite de ce travail, on pourra peut-être dégager une nouvelle technique pour apprécier ce caractère, qui ne méritera plus les critiques que nous avons formulées.

A. rancens Beijerinck, constitue 24 p. 100 de nos souches. On constate avec cette espèce comme avec la précédente qu'il existe des souches incapables de suroxyder l'acide acétique.

A. mesoxydans Frateur, constitue 19 p. 100 de nos isolements. Nous avons classé dans cette espèce des souches présentant un pouvoir cétogène certain sur mannite et sur glucose, mais ne produisant pas de dioxyacétone à partir de la glycérine.

TABLEAU V

Identification des souches personnelles.

Souches	Catalyse	Oxydation de l'acide acétique	Oxydation de l'acide lactique	Oxydation du glucose	Pouvoir cétogène			Milieu de Hoyer modifié		Groupe	Espèce
					Glycérol	Mannite	Gluconate				
AB. 1 ...	+	+	+	+	—		—	Toujours Négatif		Oxydans.	*A. rancens.*
AB. 2 ...	—	+	+	—	—		—			Peroxydans.	*A. paradoxum.*
AB. 3 ...	+	—	+	—	—		—			Oxydans.	*A. ascendens.*
AB. 4 ...	+	—	+	—	—		—			Oxydans.	*A. ascendens.*
AB. 5 ...	+	—	+	—	—		—			Oxydans.	*A. ascendens.*
AB. 6 ...	—	+	+	—	—		—			Peroxydans.	*A. paradoxum.*
AB. 8 ...	+	—	—	+	+		+			Suboxydans.	*A. suboxydans.*
AB. 10 ..	+	—	+	—	—		—			Oxydans.	*A. ascendens.*
AB. 11 ..	+	+	+	+	—		—			Oxydans.	*A. rancens.*
AB. 12 ..	—	+	+	—	—		—			Peroxydans.	*A. paradoxum.*
AB. 13 ..	+	+	+	+	—		—			Oxydans.	*A. rancens.*
AB. 14 ..	+	+	+	+	+	+	+			Mesoxydans.	*A. mesoxydans.*
AB. 15 ..	—	+	+	—	—		—			Peroxydans.	*A. paradoxum.*
AB. 16 ..	—	+	+	—	—		—			Peroxydans.	*A. paradoxum.*
AB. 17 ..	+	+	+	+	—		—			Oxydans.	*A. rancens.*
AB. 18 ..	+	—	+	+	—		+			Oxydans.	*A. rancens.*
AB. 20 ..	+	+	+	+	+	+	—			Mesoxydans.	*A. mesoxydans.*
AB. 21 ..	—	—	+	—	—		—			Peroxydans.	*A. paradoxum.*
AB. 23 ..	+	+	+	+	—	+	—			Mesoxydans.	*A. mesoxydans.*
AB. 24 ..	—	+	+	—	—		—			Peroxydans.	*A. paradoxum.*
AB. 25 ..	+	—	—	—	—		—		*		
AB. 26 ..	—	+	+	—	—		—			Peroxydans.	*A. paradoxum.*
AB. 27 ..	+	+	+	+	—	+	—			Mesoxydans.	*A. mesoxydans.*
AB. 28 ..	+	+	+	+	—	+	—			Mesoxydans.	*A. mesoxydans.*
AB. 29 ..	+	+	+	—	—	—	—			Oxydans.	*A. ascendens.*
AB. 30 ..	+	+	+	+	—	—	—			Oxydans.	*A. rancens.*
AB. 31 ..	+	+	+	+	—	—	—			Mesoxydans.	*A. mesoxydans.*
AB. 33 ..	+	+	+	+	—	—	—			Oxydans.	*A. rancens.*
AB. 34 ..	—	+	+	—	—	—	—			Peroxydans.	*A. paradoxum.*
AB. 35 ..	—	+	+	—	—	—	—			Peroxydans.	*A. paradoxum.*
AB. 37 ..	+	+	+	+	—	+	+			Mesoxydans.	*A. mesoxydans.*
AB. 40 ..	+	+	+	—	—	—	—			Oxydans.	*A. ascendens.*
AB. 43 ..	+	+	+	+	—	—	+			Oxydans.	*A. rancens.*
AB. 45 ..	+	—	+	+	—	—	—			Oxydans.	*A. rancens.*
AB. 49 ..	—	+	+	—	—	—	—			Peroxydans.	*A. paradoxum.*
AB. 50 ..	—	+	+	—	—	—	—			Peroxydans.	*A. paradoxum.*
AB. 51 ..	+	+	+	—	—	—	—			Oxydans.	*A. ascendens.*

(*) Croissance très faible.

Pour la souche AB 23 on a constaté que le glycérol est oxydé au Warburg par des cellules non proliférantes, alors que cette propriété n'a

pu être mise en évidence par la technique habituelle des oxydogrammes. Ceci s'explique, car cette souche décarboxyle assez rapidement la dioxyacétone produite ; le coefficient respiratoire $\frac{CO^2}{O^2}$ qui est en effet de 0,83 laisse à penser que la glycérine est entièrement oxydée sans que la dioxyacétone s'accumule dans le milieu.

Les autres caractères décrits par FRATEUR pour cette nouvelle espèce se retrouvent dans toutes nos souches :

— bon développement sur bière ou moût de bière,

— pas de formation d'acide à partir du maltose et du saccharose.

L'espèce *A. mesoxydans* Frateur, isolée dans la bière se rencontre donc avec une certaine fréquence dans le vin. Le maintien d'une espèce nouvelle est donc pleinement justifié. Nous ne pensons pas que les différences observées dans le pouvoir cétogène soient suffisantes pour créer de nouvelles espèces. Peut-être pourrait-on créer une variété nouvelle pour les espèces qui ne produisent pas de dioxyacétone tout en produisant du lévulose sur mannite. Cette propriété semble constituer une transition entre les microorganismes ne possédant pas de pouvoir cétogène et ceux qui en sont pourvus.

D'après nos isolements, toutes les souches qui oxydent la glycérine oxydent aussi la mannite. C'est donc que la production de dioxyacétone constitue un pas de plus vers des espèces possédant un pouvoir cétogène de plus en plus renforcé.

La souche identifiée à *A. suboxydans* Kluyver et de Leouw, ne se rencontre qu'à une fréquence très faible dans les vins que nous avons examinés. Elle correspond bien au type décrit par FRATEUR, sauf qu'elle pousse mal sur maltose et ne l'oxyde pas. La forme de la colonie géante que nous avons obtenue est caractéristique et identique à la photographie publiée par TOSIC et WALKER (17).

Une souche AB 25 n'a pu être classée d'après les données de FRATEUR. Avec cette souche on n'est pas arrivé à mettre en évidence la suroxydation de l'acide acétique et l'oxydation du lactate de calcium.

On a remarqué que cette souche se développait très mal sur tous les milieux qui ne contiennent pas d'alcool. Cette particularité gêne beaucoup l'exécution des divers tests.

IV. — CONSERVATIONS DES SOUCHES

Les souches ainsi isolées ont été conservées par des repiquages sur du moût de bière alcoolique gélosé. La durée de conservation sur un tel milieu est de l'ordre de 15 jours.

Quelques souches se sont révélées beaucoup plus fragiles et se sont

éteintes après quelques repiquages hebdomadaires sans que l'on ait pu procéder à leur identification.

Pour s'affranchir de ces repiquages, deux techniques de conservation ont été essayées.

1° La Lyophilisation.

Une culture jeune sur moût de bière gélosé est émulsionnée dans du petit lait stérile. On le répartit dans de petits tubes en pyrex. Après congélation on adapte ces tubes à un appareil à lyophiliser. On scelle sous vide.

Cinq de nos souches ont été traitées et conservées par la suite à l'obscurité en cave froide 12°-15°. Par la suite nous avons procédé à des contrôles de survie en ensemençant le contenu des tubes dans un milieu liquide constitué de moût de bière alcoolisé à 2 p. 100 (tableau VI).

TABLEAU VI

Durée de survie des souches lyophilisées.

Lyophilisation Janvier 1952	Souches			
	AB. 1	AB. 8	AB. 11	AB. 20
Mise en culture après 3 mois	+	+	+	+
— — 6 —	+	+	+	+
— — 11 —	+	+	+	+
— — 26 —	+	+	+	+

Ce procédé se révèle donc excellent. Il demande cependant un appareillage spécialisé qui peut faire défaut. Aussi, avons-nous expérimenté un autre procédé beaucoup plus simple que nous avons vu employer dans un laboratoire allemand à la conservation des souches de levures.

2° Conservation sous huile de paraffine.

On fait une culture en stries sur du moût de bière gélosé en culot légèrement incliné. Lorsque le développement est suffisant, on recouvre la gélose d'huile de paraffine stérile de façon à ce que le liquide dépasse de 1 cm. au moins le milieu de culture.

Si cette précaution ne se trouve pas réalisée, on court le risque de voir la gélose se dessécher après quelques mois de conservation. La culture est alors perdue.

Les tubes ainsi préparés ont été conservés dans une armoire, à l'abri de la lumière et à la température du laboratoire atteignant parfois 30°.

Après 19 mois de conservation, une partie de la culture est prélevée avec un fil de platine et ensemencée sur moût de bière gélosé, alcoolisé

à 2 p. 100. On doit s'efforcer de transporter sur le milieu neuf aussi peu d'huile de paraffine qu'il est possible. Après 8 jours à l'étuve à 28°, on note le développement (tableau VII).

TABLEAU VII

Survie des souches conservées 19 mois, sous huile de paraffine.

Désignation de la souche	Culture après 8 jours	Culture après 15 jours
AB. 23	—	—
AB. 24	+	
AB. 25	+	
AB. 26	+	
AB. 27	—	—
AB. 28	+	
AB. 29	+	
AB. 31	+	
AB. 33	+	
AB. 34	+	
AB. 35	+	
AB. 37	—	+
AB. 38	—	—
AB. 40	—	+
AB. 41	+	
L. 32	+	
L. 40	+	
L. 41	+	
L. 1376	+	

La conservation sous huile de paraffine n'est pas aussi sûre que la lyophilisation. Dans notre expérience il y a environ 15 p. 100 des cultures qui n'ont pas résisté à une conservation de 19 mois. On ne trouve aucune relation entre l'espèce et la faculté de conservation. Il semble plutôt qu'il existe une relation avec la vigueur des souches. Celles donnant sur moût de bière gélosé et alcoolisé les cultures les moins abondantes, sont celles qui ne se sont pas conservées.

CONCLUSIONS

Sur la classification de Frateur.

Cette classification que son auteur présente comme un essai, constitue d'ores et déjà un excellent moyen de travail qui nous a permis de déterminer presque toutes nos souches.

La méthode des oxydogrammes permet de rendre les tests indépendants de la croissance. Elle pourra encore être améliorée dans les cas douteux par l'étude au Warburg des échanges respiratoires. Les données obtenues par cette technique nous permettront de connaître le rapport

$\frac{CO^2}{O^2}$ pour les divers substrats et de comparer entre elles leurs vitesses d'oxydation.

Ces techniques suggèrent un problème nouveau, celui des enzymes adaptatifs. Il faudra en effet préciser si les tests utilisés ne mettent pas en jeu des enzymes adaptatifs et dans ce cas, préciser les conditions de culture des bactéries.

Nous pensons que la culture sur milieu agité est susceptible de rendre de nombreux services.

Sur les souches isolées du vin.

Les déterminations nous ont permis de retrouver, avec une fréquence assez grande, les souches qui ont été sûrement identifiées dans le vin.

Toutefois, nous n'avons pas retrouvé certaines espèces qui, d'après les traités de microbiologie, sont réputées se trouver dans le vin.

Nous pensons que HENNEBERG a introduit une confusion dans sa classification en adoptant la dénomination « Weinessigbakterie » sans préciser si les espèces ont été isolées du vin ou du vinaigre de vin. On peut en conclure en toute certitude, que la flore du vin et celle du vinaigre de vin ne sont pas identiques. Il est clair que les procédés de fabrication du vinaigre opèrent une sélection des souches et que les espèces les plus actives peuvent être des espèces très rares ou même inexistantes dans le vin.

Le procédé d'Orléans en particulier sélectionne les espèces d'après la ténacité du voile, il n'est donc pas étonnant qu'on y rencontre *A. xylinum* qui surpasse toutes les autres espèces par la résistance de son voile, alors que cette espèce n'a pu être mise en évidence dans le vin.

L'espèce *A. aceti* (Pasteur) Beijerinck n'a pu être retrouvée dans le vin, puisque aucune de nos souches n'utilise les sels ammoniacaux en présence d'alcool. Nous faisons d'ailleurs des réserves sur l'identification du *Mycoderma aceti* de PASTEUR avec l'espèce *A. aceti* (Pasteur) Beijerinck telle qu'elle est décrite par FRATEUR.

L'espèce décrite par PASTEUR n'assimilait l'azote ammoniacal qu'en présence d'alcool et d'acide acétique. Ce dernier servait-il à éviter la contamination par *Mycoderma vini* ou bien était-il indispensable pour la croissance sur milieu minéral ? L'auteur ne nous fixe pas sur ce point. Ce qui est certain, c'est que l'espèce décrite par PASTEUR provient du vin ou du vinaigre de vin. Or, les souches *A. aceti* (Pasteur) Beijerinck étudiées par FRATEUR proviennent du vinaigre d'alcool ou de brasserie.

Nos isolements personnels ne nous ont pas permis de retrouver cette espèce dans le vin. Les deux espèces diffèrent donc par leur habitat. On est alors conduit à admettre que l'espèce décrite par FRATEUR est nou-

velle puisqu'elle satisfait un nouveau test : l'utilisation de l'azote ammoniacal en présence d'alcool comme unique source de carbone. Cette espèce devra donc être attribuée à FRATEUR et porter un nouveau nom qui ne prête pas à confusion.

Quant à l'espèce décrite par PASTEUR, elle se rapproche davantage de certaines souches que nous avons isolées du vin et que nous avons identifiées à *A. mesoxydans* Frateur, d'après la classification de ce dernier.

Reçu pour publication le 8 janvier 1957.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) FRATEUR (J.). — Essai sur la systématique des Acetobacter. *La Cellule*, **53** 287-392, 1950.
(2) DUPUY (P.). — Recherche d'une technique d'isolement des Acetobacter du Vin. *Ann. de l'I. N. R. A., série E, Ann.* de *Techn.*, **1**, 107-112, 1952.
(3) PASTEUR (L.). — Études sur le Vinaigre — 1868. Œuvres III, 36, Masson, Paris, 1922.
(4) HENNEBERG (W.). — Handbuch der Gärungsbakteriologie, Berlin. Paul Parey, 1926.
(5) LAFAR (F.). — Handbuch der Techn. Myk., **5**, Iena, 1914.
(6) FUHRMANN. — *Cent. Blatt. Bakt. Abt. II*, **15**, 377, 1906. — D'après Bergeys Manual of determinative bacteriology, 1948.
(7) COZIC (M.). — Étude biochimique de B xylinum. Thèse, André Lesot, éd. Nemours, 1933.
(8) QUERE (H.). — Recherches sur la croissance et le métabolisme d'une bactérie acétique. Thèse, J. Biere, éd. Bordeaux, 1935.
(9) NEUBERG (C.) et SIMON (E.). — Ueber isoliertes Vorkommen von Carboxylase und über enzymatische Wirkungen des Essigbakterium, Bordeaux. *Biochem. Zeitsch.*, **253**, 225, 1932.
(10) MARCELLI (E.). — Contributo alla conoscenza dei batteri acetificanti. *Riv. di Vit. e Enol.*, **5**, 57-61, 85-95, 1932.
(11) WISSER'T HOOFT (F.). — Biochemische Onderzoekingen over het geslacht, Acetobacter. Diss. Delft, 1925.
(12) JORGENSEN (A.). — Microorganisms and fermentations. Ch. Griffin C°, London, 1948.
(13) FEDERICO (L.) et ANTONIANI (C.). — Ricerche sul chimisme delle fermentazione ossidative. *Ann. Chim. Appl.*, **39**, 321-330, 1949.
(14) LAMBION (R.) et WIAME (J.). — La culture pure en vinaigrerie du type rapide. *Bull. Techn. Vinaig.*, n° 7, 195-97, 1951.
(15) JANKE (A.). — Z. *Bakt. Abt II*, **45**, 27, 1916.
(16) KULDA (D.), PRESTON (J.) et WALKER (T.). — Giants, colonies of Acetobacter species as an aid to identification. J. *of Inst. of Brew.*, **55**, 141-146, 1948.
(17) TOSIC (J.) et WALKER (T.). — A procedure for the characterization of the acetic acid bacteria. *J. Soc. Chem. Ind.*, **65**, 104-107, 1946.
(18) TOSIC (J.) et WALKER (T.). — Acetobacter acidum mucosum an organism forming a starchlike polysaccharide. *J. of gen. Microbiol.*, **4**, 192-197, 1950.
(19) ASAI. — D'après une communication personnelle.
(20) RAGHAVENDRA RAO (M.) et STOKES (J.). — Nutrition of the acetic acid bacteria. *J. Bacteriol. U.* S. A., **66**, 634-638.
(21) HOYER (D.). — Bijdrage tot de Kennis van de Azijnbacteriën. Dissertation Delft, 1898.

PERSPECTIVES D'UTILISATION D'UNE LEVURE MUTANTE A LA CANAVANINE POUR LE CONTROLE DU LEVURAGE

PAR

P. GALZY et **P. DUPUY**

Station de Technologie végétale, Versailles

L'emploi de levures sélectionnées constitue une application pratique des découvertes de PASTEUR. Leur utilisation, qui a donné des résultats incontestables en brasserie où l'on faisait fermenter un milieu stérile, n'a pas eu autant de succès en œnologie. C'est que, dans cette industrie, les levures choisies par l'utilisateur sont introduites dans un milieu non stérile et se trouvent en concurrence avec celles apportées par le raisin. On a bien admis jusqu'ici que les levures sélectionnées « prenaient possession du milieu » et éliminaient les « ferments sauvages ». En réalité, l'exactitude de cette hypothèse n'a jamais été démontrée puisqu'on n'était pas parvenu à différencier dans une cuve les levures introduites par l'homme, de celles apportées par le raisin. L'utilisation d'une souche mutante à la canavanine, qui a été proposée par l'un de nous pour réaliser ce marquage, semble permettre d'aborder maintenant cette question.

Résistance des levures à la canavanine

La canavanine est un acide aminé qui inhibe à faible dose la croissance de nombreux microorganismes (1 à 3). Les levures sont particulièrement sensibles puisque leur développement est arrêté en présence de 20 mg/l. Le mécanisme d'action de ce produit n'est pas encore précisé. On sait seulement que sa faculté d'inhibition est reversible en présence d'arginine à dose quatre fois supérieure (4). La parenté chimique de ces deux corps rend très probable l'existence d'un antagonisme compétitif :

$$\begin{matrix}NH_2\\NH\end{matrix}\!\!\!>\!C - NH - O - CH_2 - CH_2 - CHNH_2 - COOH \qquad \text{Canavanine}$$

$$\begin{matrix}NH_2\\NH\end{matrix}\!\!\!>\!C - NH - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CHNH_2 - COOH \qquad \text{Arginine}$$

L'hydrolyse de la canavanine avec libération d'urée et de canaline peut se produire par action enzymatique (5). Cependant l'existence d'une canavanase n'est pas certaine et il est possible que ce soit l'arginase qui utilise ainsi ce substrat (6).

Sur un milieu contenant de la canavanine peuvent apparaître des mutants résistants. SRB (7) a montré que cette résistance était due à un facteur monogénique qui, dans les croisements qu'il a réalisés, apparaît comme un caractère récessif. Les travaux réalisés jusqu'ici montrent bien que la résistance n'est pas le résultat d'une adaptation mais bien d'une mutation affectant le patrimoine héréditaire de l'espèce. Le caractère est stable et il subsiste dans la souche adaptée même en l'absence de canavanine. Au laboratoire, nous avons vérifié qu'une souche mutante repiquée 12 fois sur jus de raisin et sur moût de bière avait conservé intégralement sa résistance à la canavanine.

Il semble qu'il existe dans la nature des souches capables de pousser spontanément sur milieu à la canavanine. Nous avons testé sur ce point 25 souches de levures de vin maintenues en collection : deux d'entre elles donnent une croissance rapide et abondante sur canavanine sans qu'une mutation paraisse nécessaire.

Obtention de la souche résistante

Les souches mutantes, employées au cours de ce travail ont été obtenues en utilisant une technique déjà décrite par l'un de nous (8).

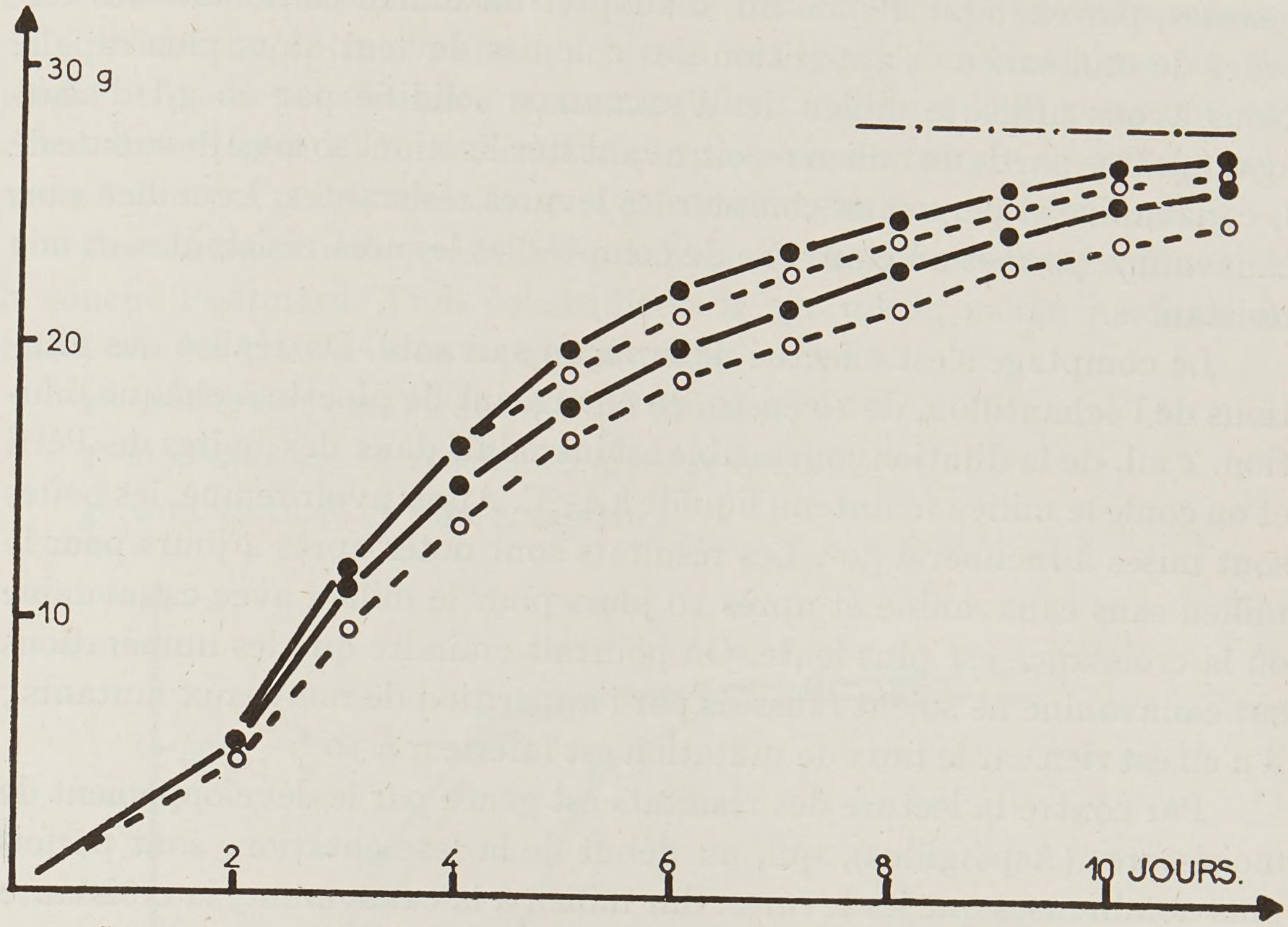
Deux ml d'une culture jeune sont coulés dans une boîte de Pétri contenant le milieu suivant :

Sulfate d'ammonium	5 g.
Phosphate monopotassique	1
Sulfate de magnésium	0,5
Glucose	20
Agar-agar	20
Sulfate de l. canavanine	0,040
Eau, Q.s.p.	1 litre

Après une semaine d'incubation, les levures mutantes apparaissent sous la forme de petites colonies isolées. Il est nécessaire de purifier la colonie prélevée car elle peut être encore souillée par des levures non mutantes qui ont été ensemencées en très grand nombre. On y parvient facilement en faisant des subcultures sur le même milieu et en terminant par un isolement.

Une souche déterminée peut donner naissance à plusieurs sortes de mutants. Ils diffèrent en particulier par leur aptitude à fermenter. C'est ainsi que sur 6 mutants de la levure « Pommard » on n'en a trouvé qu'un seul capable de fermenter le jus de raisin avec une vitesse appréciable. Il est donc nécessaire avant d'utiliser une souche mutante de s'assurer qu'elle fermente avec la même vitesse que la souche initiale.

Le graphique 1 donne les courbes de fermentation obtenues avec les deux souches Beaujolais et Beaujolais mutant sur jus de raisin désulfité. Il a été réalisé en déterminant à 27°, les pertes de poids de flacons de 500 cc portant une effilure et contenant 350 cc de jus de raisin désulfité. L'expérience a été répétée deux fois et a montré que les deux souches possédaient approximativement les mêmes vitesses de fermentation.



GRAPHIQUE 1. — Fermentation de jus de raisin désulfité avec la souche.
Beaujolais : ●————●
et son mutant : ○- - - - - -○

Perte de poids pour 350 ml de jus. Température 27°.

Les deux souches mutantes utilisées dans nos essais provenaient de levures habituellement utilisées dans la pratique, à savoir :

souche Beaujolais n° 1 de l'Institut coopératif de Montpellier ;

souche Pommard de l'Institut Pasteur.

Technique de numération

Il paraît donc facile d'après ce qui vient d'être exposé de réaliser des numérations des seules cellules du mutant en faisant un comptage sur milieu à la canavanine. Toutefois, il faut rejeter par avance tous les milieux naturels, en particulier le moût de bière et le jus de raisin qui sont susceptibles de contenir de l'arginine et de masquer ainsi l'action inhibitrice de la canavanine. Pour la même raison on a éliminé la gélatine comme solidifiant.

Avec les souches Beaujolais et Beaujolais mutant, on a pu utiliser pour les numérations, le milieu très simple déjà décrit lors de l'obtention de la souche. Ces souches sont en effet très peu exigeantes vis-à-vis des facteurs de croissance et sont capables de donner sur ce milieu, des colonies assez importantes pour être dénombrées.

Il est apparu cependant indispensable, avec des souches plus exigeantes, par exemple Pommard, d'adopter un milieu contenant des facteurs de croissance. L'apparition des colonies devient alors plus rapide. Nous avons utilisé le milieu de WICKERHAM solidifié par 20 g/l d'agar-agar (9). Une partie du milieu reçoit, avant stérilisation, 20 mg/l de sulfate de L-canavanine et permet de compter les levures résistantes. Le milieu sans canavanine permet au contraire de compter les levures résistantes et non résistantes.

Le comptage s'est effectué de la façon suivante. On réalise des dilutions de l'échantillon, de 10 en 10, en changeant de pipette à chaque dilution. 1 ml. de la dilution convenable est introduit dans des boîtes de Pétri et on coule le milieu maintenu liquide à 45°C. Après avoir remué, les boîtes sont mises à incuber à 30°. Les résultats sont notés après 4 jours pour le milieu sans canavanine et après 10 jours pour le milieu avec canavanine où la croissance est plus lente. On pourrait craindre que les numérations sur canavanine ne soient faussées par l'apparition de nouveaux mutants ; il n'en est rien car le taux de mutation est inférieur à 10^{-6}.

Par contre la lecture des résultats est gênée par le développement de moisissures (Aspergillus), qui, au début de la fermentation, sont parfois plus nombreuses que les levures. Sur milieu à la canavanine, la croissance des moisissures ne semble pas ralentie comme celle des levures.

Expériences de laboratoire

Dans une première expérience, on a cherché à voir si le caractère de résistance à la canavanine se conservait au cours d'une fermentation de jus de raisin stérilisé. On a donc réalisé des comptages successifs sur milieu avec et sans canavanine (tableau I).

TABLEAU I

Numération des levures au cours d'une fermentation pure de jus de raisin par la souche Beaujolais mutant.

Jours	Levures en million par ml. comptées :		Pourcentage des levures se développant sur milieu *avec* canavanine
	sur milieu sans canavanine	sur milieu avec canavanine	
1	5,65	6,25	100 %
2	13,0	2,9	22
3	101,5	25,5	25
4	101	1	1

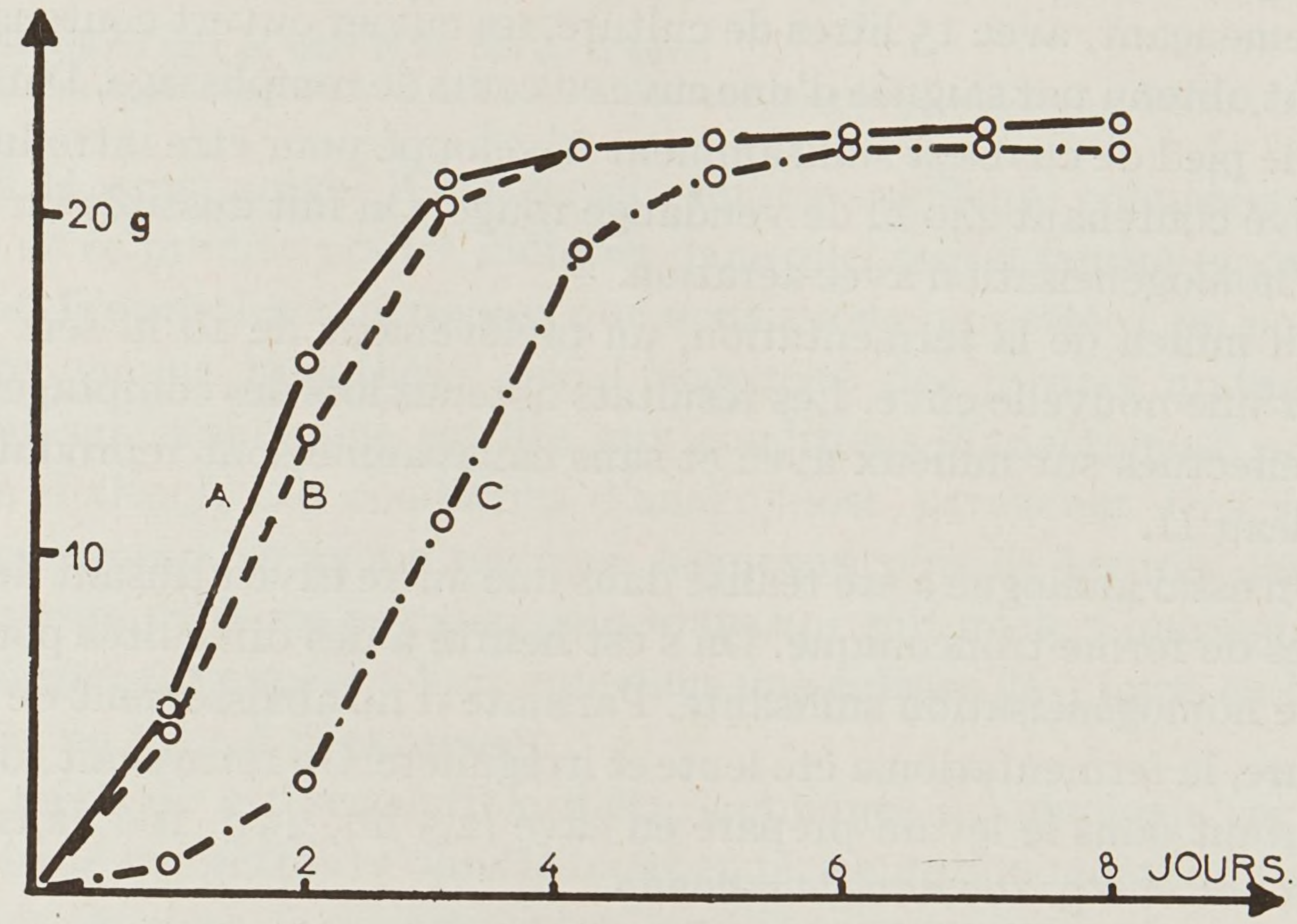
Après cette expérience, on est donc obligé de conclure qu'en culture pure, l'expression du caractère « résistance à la canavanine » disparaît au cours de la fermentation. Ce fait nouveau et surprenant, a été confirmé par d'autres expériences sur le même mutant et sur un mutant de la souche Pommard. Il semble que la perte de l'expression de ce caractère dépende du milieu et des conditions de culture. C'est ainsi que pour des cultures faites en tubes à essais contenant 8 ml de milieu et bouchés au coton, on a trouvé qu'après 7 jours, 57 p. 100 des levures cultivées sur jus de raisin peuvent pousser sur canavanine alors que 89 p. 100 poussent sur canavanine lorsqu'elles sont cultivées sur moût de bière. Ces mêmes cultures rajeunies poussent à 100 p. 100 sur canavanine.

Une autre expérience de laboratoire a été réalisée avec un mutant de la souche Pommard. Trois échantillons de 350 ml du même jus frais de raisin ont été traités de la façon suivante :

1° stérilisé et ensemencé avec le mutant ;

2° non stérilisé et ensemencé avec le mutant ;

3° non stérilisé et non ensemencé.



Levures en millions par ml. comptées sur milieu sans canavanine et sur milieu canavanine :

Jours	A			B			C		
	sans	avec	%	sans	avec	%	sans	avec	%
0	2,0	1,6	80	2,0	1,6	80	0,035	0,0001	3
1	54	25,5	74	86	71	74	0,55	0,01	2
2	90	24	27	62	40	64	23	0,01	0

Graphique II. — Fermentation de jus de raisin frais avec le mutant de la souche « Pommard ». Pertes de poids pour 350 ml de jus. Température 27°. — A : jus non stérilisé, ensemencé. — B : jus stérilisé, ensemencé. — C : jus non stérilisé, non ensemencé. Témoin.

L'ensemencement introduisait 2.10^6 levures au ml. alors que le jus ne contenait que 35.10^3 levures par ml.

Tous les résultats obtenus sont donnés sur le graphique II.

Il apparaît nettement que les levures capables de pousser sur canavanine ne sont pas moins nombreuses dans l'essai ensemencé qui n'a pas été stérilisé. Il semble donc que les levures introduites se sont multipliées plus rapidement que les levures indigènes.

Essais en cave

Au cours des vendanges 1956, une expérience a été réalisée dans une cave du Languedoc possédant des cuves de fermentation à cuvon supérieur ouvert. Voici la chronologie des opérations effectuées :

La culture de départ est réalisée stérilement au laboratoire dans un tank avec aération. Le milieu utilisé est du jus de raisin dilué additionné de 2 p. 1000 d'autolysat de levure. La culture est restée 14 heures à la glacière avant d'être utilisée.

Le pied de cuve est préparé dans la cave le premier jour des vendanges en ensemençant, avec 15 litres de culture, un cuvier ouvert contenant 4 hl de moût obtenu par saignée d'une cuve en cours de remplissage. Deux jours après, le pied de cuve est suffisamment développé pour être introduit dans une cuve contenant 240 hl de vendange rouge. On fait aussitôt un remontage d'homogénéisation avec aération.

Au milieu de la fermentation, un prélèvement de 10 hl sert à ensemencer une nouvelle cuve. Les résultats obtenus lors des comptages quotidiens effectués sur milieux avec et sans canavanine sont reproduits dans le tableau II.

Un essai analogue a été réalisé dans une autre cave utilisant des cuves fermées de forme tronconique. On s'est heurté à des difficultés pour réaliser une homogénéisation suffisante. Par suite d'un abaissement de la température, la fermentation a été lente et irrégulière. On retrouvait 100 p. 100 du mutant dans le levain préparé en cave (2,5 hl), 25 p. 100 dans la première cuve et 0 p. 100 dans la seconde.

Discussion

L'application de la méthode déjà proposée se révèle, d'après ces nouveaux essais, plus difficile qu'on ne l'avait prévu. En effet, les levures ne sont pas toujours capables d'exprimer leur faculté de pousser sur un milieu à la canavanine. Ce fait, qui jusqu'ici avait échappé aux expérimentateurs, empêchera de tirer des conclusions quantitatives des expériences déjà réalisées. On peut cependant espérer que la méthode est perfectible et qu'on parviendra à faire pousser régulièrement une levure mutante sur

TABLEAU II

Levurage de vendange avec la souche Beaujolais mutant.

	Dates	Densité du moût	Levures en million au ml. comptées :		Pourcentage des levures se développant sur milieu avec canavanine
			sur milieu sans canavanine	sur milieu avec canavanine	
Levain : 15 l	22—10 8 h		255	⩽ 5	⩽ 2
Pied de cuve : 15 l de levain dans 4 hl	22—10 11 h		6,53	2,5	40
	22—10 20 h		7,7	2,1	29
	23—10 19 h		11,0	11,4	94
	24—10 12 h		117	75,5	65
1ere Cuve : 4 hl de pied de cuve dans 240 hl	24—10 12 h	1,083	6,0	4,1	68
	25—10 15 h	1,080	22*	11,8	49
			28*	11	40
	26—10 15 h	1,028	100	⩽ 3	⩽ 3
	27—10 15 h	1,005	76	1	1,2
2eme Cuve : le 26—10 on ensemence 250 hl avec 10 hl de 1ere cuve	27—10 15 h		5,3	1,6	30
	29—10 8 h		77,5	0,5	0,65
Cuve témoin non ensemencée	29—10 8 h	1,064	41	⩽ 0,5	⩽ 1

*2 échantillons pris en haut et en bas de la cuve.

milieu à la canavanine. Il est certain qu'une meilleure connaissance de l'action de ce produit pourra indiquer dans quel sens il faudra modifier la méthode. D'après les expériences que nous avons rapportées, on pourrait admettre comme hypothèse, que l'incapacité des levures mutantes à repousser sur canavanine est liée aux conditions d'anaérobiose ou à la présence d'alcool. Les conditions d'anaérobiose paraissent très importantes puisque nous avons retrouvé beaucoup plus de levures capables de pousser en présence de canavanine dans une culture de 7 jours sur tube à essai largement exposé à l'air, que dans une culture de 3 jours en ballon fermé par un tube à dégagement.

La méthode est susceptible d'être appliquée à l'œnologie car nous avons vérifié qu'on trouve dans le moût en fermentation moins de 1 p. 100 de levures capables de pousser sur milieu à la canavanine.

Le pourcentage de levures qui se sont développées sur milieu à la canavanine est aussi important dans l'essai en cave que dans l'expérience de laboratoire. On peut donc admettre que les levures apportées ont pris une part importante à la fermentation, mais il faut remarquer que l'expérience en cave a été effectuée dans de très bonnes conditions rarement réalisées dans la pratique. On ne peut donc, à la lumière de cette seule expérience, porter un jugement sur l'utilisation des levures sélectionnées.

Dans son état actuel, la méthode ne peut pas être utilisée pour contrôler l'efficacité d'un levurage dans la pratique. Il est cependant vraisem-

blable que des modifications de technique permettront de l'améliorer et de pouvoir préciser davantage les conditions d'utilisation des levains dans l'industrie.

RÉSUMÉ

On a essayé de retrouver dans un liquide en fermentation une souche de levure mutante à la canavanine utilisée comme levain. Le comptage sur milieu sélectif à la canavanine ne s'est pas montré très précis, les levures perdant rapidement l'expression de leur potentialité de croissance en présence de cet inhibiteur. Il semble cependant que dans l'expérience en cause que nous avons rapportée, les levures introduites au début se retrouvent en proportions assez importantes au cours de la fermentation.

Reçu pour publication le 30 novembre 1956.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Horowitz (N.) et Srb (A.). — Growth inhibition of Neurospora by canavanine and its reversal. *J. Biol. Chem.*, **174**, 371-8, 1948.

(2) Volcani (B.) et Snell (E.). — The effects of canavanine, arginine and related compounds on the growth of bacteria. *J. Biol. Chem.*, **174**, 893-902, 1948.

(3) Suzuki (T.) et Muraoka (S.). — Antimetabolites of amino acids. *J. pharm. Soc. Japan*, **74**, 534-43, 1954.

(4) Srb (A.). — Effet antibiotique de la canavanine sur la levure. *C. R. Ac. Sci.*, **239**, 447-8, 1954.

(5) Kitagawa (M.) et Tomita (T.). — New basic compound in jackbean, from which urea is split off by a liver enzyme. *Proc. Imp. Acad. Tokyo*, **5**, 380-3, 1929.

(6) Damodaran (M.) et Narayanan (K.). — A comparative study of arginase and canavanase. *Biochem. J.*, **34**, 1449-59, 1940.

(7) Srb (A.). — Spontaneous and chemically induced mutations giving rise to canavanine resistance in yeast. *C. R. Lab. Carlsberg*, série Physiol., **26**, 363-380, 1956.

(8) Galzy (P.). — Essais de contrôle de l'efficacité d'un levurage. *Progrès agricole et viticole*, **145**, 95-99, 1956.

(9) Wickerham (L.). — A critical evaluation of the nitrogen assimilation tests commonly used in the classification of yeasts. *J. of Bact.*, **52**, 293-301, 1946.

Le Directeur-Gérant : B. Laclavière.

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 13-5-1957.

Dépôt légal: 2e trimestre 1957 *N° d'impression: 300*

ÉTUDE DE LA LIBÉRATION D'AZOTE NON PROTÉIQUE PAR LA PRÉSURE DANS LE LAIT DE DIFFÉRENTES ESPÈCES ANIMALES

PAR

J. GARNIER

Station centrale de Microbiologie et de Recherches laitières, Jouy-en-Josas.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

II. — Techniques.

1. Solutions d'enzyme
2. Substrats
3. Température
4. Déprotéinisation.

III. — Résultats.

a) Laits de brebis et de chèvre
b) Laits chauffés et non chauffés
c) Laits de vaches à coagulation lente ou rapide.

IV. — Discussion.

Résumé.

I. — INTRODUCTION

On connaît l'activité coagulante de la présure sur le lait de vache et les solutions de caséinate de calcium et l'on sait d'autre part qu'en l'absence d'ions calcium ou de tout autre ion divalent la coagulation ne se produit pas. Cependant si, à des solutions de caséinate de sodium ayant subi l'action de la présure, on ajoute de faibles quantités d'ions calcium, il s'ensuit une coagulation immédiate, même si auparavant l'enzyme a été inactivé par addition de formaldéhyde (1).

D'autre part, à basse température (0°C) la coagulation du lait par la présure ne se produit pas ou seulement après un temps très long. Par exemple une dose de présure, suffisante pour coaguler un lait de mélange en dix minutes à 40°C, ne coagule ce même lait qu'au bout de cinq jours à 0°C (2). Mais si l'on prélève, à des intervalles de temps réguliers, un échantillon de lait emprésuré maintenu à 0°C et que l'on porte rapide-

ment cet échantillon de lait à 40° C, on constate que le temps au bout duquel se produit la coagulation à 40°C devient de plus en plus court. Après environ deux heures de maintien à 0°C le temps de coagulation atteint une valeur limite, très courte.

C'est pourquoi différents auteurs ont été conduits à distinguer, au cours du phénomène de coagulation, au moins deux réactions : une réaction primaire enzymatique et une réaction de coagulation. Cette dernière a un coefficient de température aussi élevé que celui d'une dénaturation (3), elle est donc très lente à 0°C, et ne se produit qu'en présence d'ions divalents, notamment les ions calcium.

Au cours de la réaction enzymatique, l'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100 (N. P. N.) augmente pour atteindre une valeur limite de 1,5 à 2 p. 100 de l'azote de la caséine (4). En déféquant avec des concentrations plus faibles en acide trichloracétique, le N. P. N. n'atteint pas un palier mais continue à croître lentement au cours d'une seconde phase, dite phase de protéolyse générale. Cette phase n'est pas spécifique de la coagulation car elle se poursuit après elle. Pendant la première phase, ou phase primaire d'action de la présure, le nombre de liaisons peptidiques rompues est très faible, et à peine mesurable alors que le nombre maximum de liaisons peptidiques hydrolysées par la présure est d'une pour trente trois (5).

D'autres enzymes protéolytiques à activité coagulante, en particulier la pepsine, libèrent le N. P. N. d'une façon analogue : on observe une libération primaire rapide au cours de laquelle le lait coagule, puis une protéolyse plus lente (6).

La caséine totale et la caséine α préparées à partir du lait de vache donnent des courbes de NPN en fonction du temps très semblables à celle du lait. Par contre la caséine β ne montrerait uniquement que la seconde phase de protéolyse non spécifique (7). Or la sensibilité aux ions Ca^{++} de la caséine α augmente fortement après l'action de la présure (8).

Enfin il est possible d'établir un parallèle entre les phénomènes observés au moment de la coagulation du lait ou des solutions de caséinates alcalino-terreux et ceux qui ont été décrits à propos de la coagulation du sang. En effet la thrombine solubilise, dans l'acide trichloracétique, 3 p. 100 du fibrinogène (fibrino-peptide) (9). On pense (10-11) que la fibrine formée se polymériserait par la mise en jeu de nouvelles charges électrostatiques, le départ du ou des fibrino-peptides correspondant à une perte de charges négatives. Cette polymérisation primaire évoluerait ensuite pour donner finalement le coagulum de fibrine.

Tous ces faits inclinent à penser que la libération rapide de peptides (NPN) est peut être une condition nécessaire à la coagulation du lait et en représente la cause initiale.

Nous avons voulu vérifier si, pour le lait d'espèces animales autres

que l'espèce bovine, en particulier le lait des espèces ovine et caprine, on retrouve qualitativement et quantitativement la libération de NPN.

D'autre part, dans le but de relier le NPN et la coagulation, nous avons étudié des laits dont le temps de coagulation est très long. Nous avons choisi pour cela le lait « lent » produit par certaines vaches laitières et le lait de vache chauffé au voisinage de 100°C. Nous avons vérifié également le comportement des laits de chèvre et de brebis lorsqu'ils sont soumis au même chauffage que celui appliqué au lait de vache.

II. — TECHNIQUES

1. — Solutions d'enzyme.

a) Présure commerciale.

On prépare une solution dans l'eau distillée de présure en poudre [1] et on ajoute 5 cm³ de cette solution à 100 cm³ de lait. La quantité de présure ainsi ajoutée au lait correspond à une dose de 0,1 mg de présure en poudre pour 1 cm³ de mélange réagissant (lait + présure). Avec cette dose, la coagulation d'un échantillon de lait « cru normal » se produit en 10 minutes à 25°C, avec des variations de 2 minutes en plus ou en moins d'un échantillon de lait cru à l'autre.

b) Présure cristallisée (12).

La solution [2] stock conservée à la glacière est diluée extemporanément au 1/20 et 4 cm³ de cette dilution sont ajoutés à 175 cm³ de caséinate de soude à pH 7,0. La concentration finale en présure cristallisée est de 1,5 μ g, ou 0,07 U. P/cm³ de mélange réagissant.

2. — Substrats.

Les laits utilisés sont des laits de mélange provenant de la traite de 4 à 20 animaux. Les vaches, brebis et chèvres appartiennent au troupeau laitier du Centre National de Recherches Zootechniques. Les laits sont prélevés à la traite du matin, écrémés à 30°C dans une petite écrémeuse Alfa-Laval, et additionnés de toluène à raison de 0,1 p. 100 afin d'empêcher le développement microbien.

Le lait qui doit subir le chauffage est réparti, à raison de 200 cm³, en erlenmeyer bouché. Puis il est porté au bain-marie à 100°C. Dans ces conditions, le lait atteint une température de 95°C en quinze minutes. Cette température est maintenue (± 1°) pendant quinze autres minutes.

[1] Présure Fabre à Aubervilliers (Seine).
[2] Cette solution a été obligeamment mise à notre disposition par C. Alais.

L'erlenmeyer est alors refroidi sous l'eau du robinet. Un tel chauffage est suffisant pour dénaturer les albumines et les globulines du lait qui précipitent ensuite avec la caséine lorsque le lait est acidifié à pH 4,6 (13).

La caséine de brebis a été préparée à partir du lait de brebis écrémé frais soumis à 4 précipitations successives à pH = 4,7 par HCl N. Après chaque précipitation on lave deux fois à l'eau distillée et on redissout à pH = 7 par NaOH N. Finalement on triture dans l'alcool et on extrait à l'éther pendant 8 heures. La caséine de chèvre a été préparée de la même manière (1).

3. — Température.

Toutes les expériences sont faites à 25°C (± 0°,1).

4. — Déprotéinisation.

Un volume de mélange réagissant est ajouté à quatre volumes d'acide trichloracétique à 15 p. 100 de sorte que la concentration finale en acide trichloracétique soit de 12 p. 100. Il est important d'opérer rapidement. Aussi nous avons prélevé le lait à l'aide d'une seringue à butée qui permet une évacuation très rapide du volume de lait prélevé et un mélange en 3 à 5 secondes avec l'acide trichloracétique. Nous avons vérifié que les mesures de volume au moyen de la seringue sont bien reproductibles (± 0,03 p. 100). Il est possible d'effectuer ces prélèvements même après la coagulation en agitant mécaniquement le lait emprésuré de façon à empêcher la séparation du coagulum et du lactosérum et à maintenir le lait à l'état de suspension homogène.

Après 30 à 40 minutes de séjour à la température du laboratoire, le précipité est filtré sur papier sans cendres (Durieux). Nous avons utilisé les filtres Durieux à filtration courante pour tous les laits autres que les laits chauffés de brebis et de chèvre. Pour ces derniers il est nécessaire d'utiliser les filtres Durieux à filtration lente afin d'obtenir un filtrat clair. Le dosage de l'azote du filtrat est effectué par semi-micro-kjeldahl. Nous avons titré avec l'acide chlorhydrique N/50 dans 5 cm^3 d'acide borique à 4 p. 100 en présence de l'indicateur de Tashiro.

Le témoin, réprésentant le temps zéro d'action de la présure, est obtenu en ajoutant, au lait ou à la solution de caséine, la solution de présure préalablement portée à l'ébullition.

La détermination de la teneur en azote total et en azote caséine du lait a été effectuée selon la technique de ROWLAND (14).

(1) Cette caséine de chèvre nous a été aimablement fournie par le Professeur NITSCHMANN de l'Université de Berne (Suisse) à qui nous adressons ici tous nos remerciements.

III. — RÉSULTATS

a) Laits de brebis et de chèvre.

La libération d'azote non-protéique en fonction du temps a été comparée à celle du lait de vache. Le lait de chèvre se comporte comme le lait de vache : le NPN croît rapidement pour atteindre au bout de 15 à 20 minutes une valeur limite de 1,5 à 2 p. 100 de l'azote de la caséine

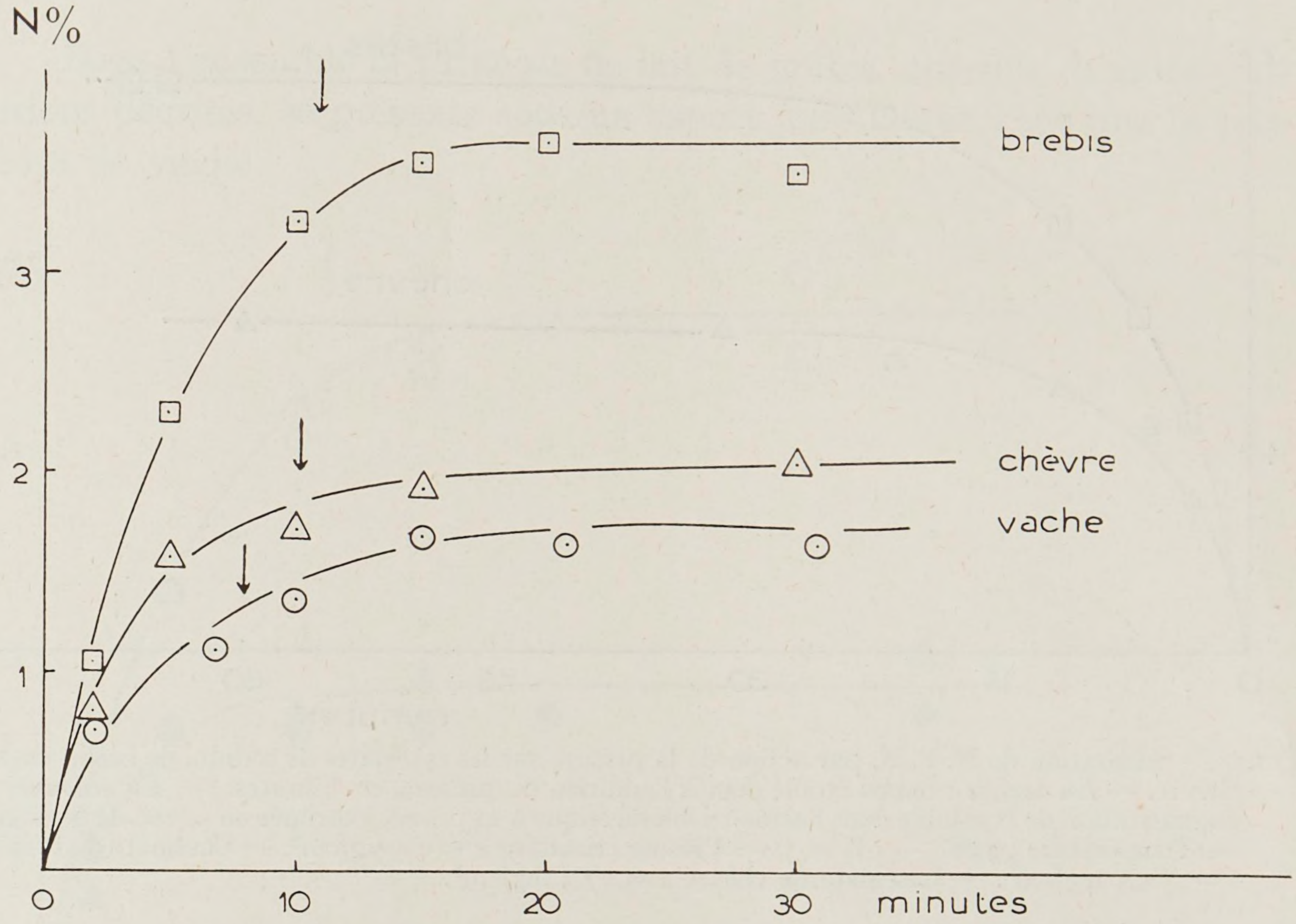


FIG. 1. — Libération de N. P. N. dans les laits de vache, de chèvre et de brebis — *En abscisse* : temps écoulé depuis l'addition de présure, en minutes. — *En ordonnée* : augmentation de N soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100 exprimée en p. 100 de N de la caséine. — Température : 25°C. — Présure commerciale : $e = 0,1$ mg/cm³. — ↓ coagulation.

(fig. 1). Dans le lait de brebis, la quantité finale d'azote non protéique libéré est sensiblement deux fois plus grande que dans le lait de vache soit 3 à 4 p. 100 de l'azote de la caséine. Ceci est confirmé par l'étude des caséinates. Cependant il faut noter que les paliers atteints avec les caséinates (fig. 2) sont légèrement inférieurs à ceux obtenus avec les laits correspondants.

La valeur finale du NPN de la caséine de brebis varie peu, entre 2 et 12 p. 100 d'acide trichloracétique contrairement à ce qui se passe avec la caséine de vache et, à un moindre degré, avec la caséine de chèvre.

Une étude électrophorétique du NPN de la caséine de vache a déjà

montré que l'acide trichloracétique à différentes concentrations, produit un véritable fractionnement (15). On pouvait donc penser que le faible fractionnement observé dans le cas de la caséine de brebis était dû entre autres choses à une plus grande homogénéité du NPN et de l'ensemble des substances azotées qui sont détachées de la caséine sous l'action de la présure et qui constituent la « protéose » ou « Molken-albumose » de Hammarsten. Pour vérifier cette dernière hypothèse nous avons préparé

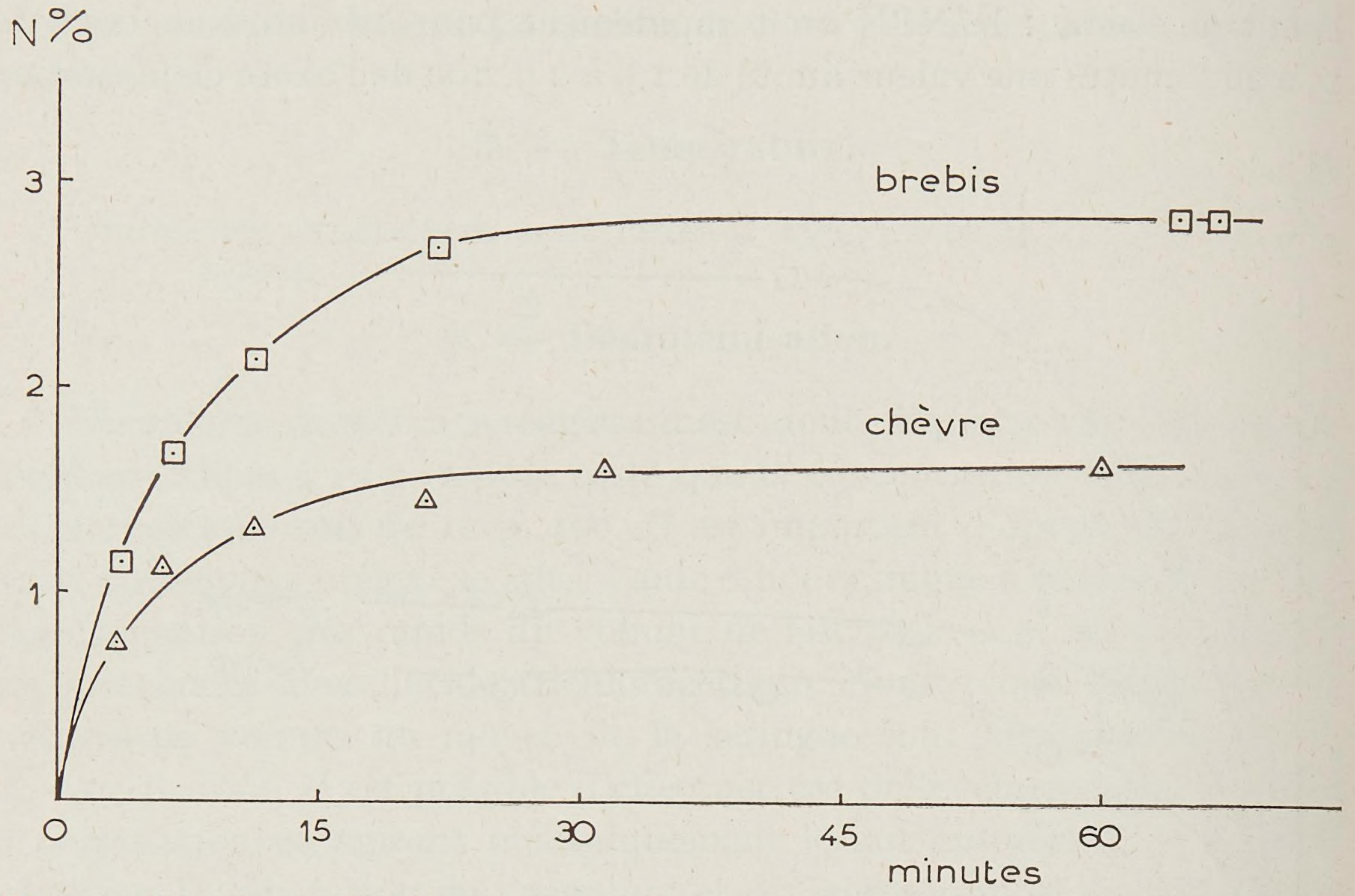


FIG. 2. — Libération de N. P. N. par action de la présure sur les caséinates de sodium de brebis et de chèvre. — *En abcisse* : temps écoulé depuis l'addition de présure, en minutes. — *En ordonnée* : augmentation de N soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100, exprimée en p. 100 de N total. — Température : 25°C — pH = 7. — Présure cristalline e = 1,5 μg/cm³. — Caséinate de brebis s = 24,5 mg/cm³. — Caséinate de chèvre s = 27,3 mg/cm³.

la protéose à partir du phosphocaséinate de lait de brebis obtenu par super-centrifugation à la Sharples (30 minutes à 35 000 t/min soit environ 30 000 × g). Le précipité de phosphocaséinate a été lavé quatre fois dans l'eau distillée. Après la dernière remise en suspension nous lui avons ajouté du chlorure de calcium à raison de 15 mg de Ca^{++} p. 100 cm³ d'une suspension à 6 p. 100 de phosphocaséinate. Puis nous avons coagulé ce phosphocaséinate à 30°C avec la solution de présure cristallisée à la concentration de 0,02 U. P./cm³ ou 0,42 μ g/cm³. Le coagulum est alors centrifugé 5 minutes à 35 000 t/min (30 000 × g), le surnageant recueilli et lyophilisé. L'azote contenu dans le surnageant représente environ 3,4 p. 100 de l'azote du phosphocaséinate. Le diagramme électrophorétique [1] montre 5 composants (fig. 3) dont deux de mobilité 5,6 et 6,6 que l'on peut assimiler aux deux principaux composants de la protéose de vache

[1] L'électrophorèse a été effectuée par le Centre d'électrophorèse du C. N. R. S.

de mobilité 6 et 6,8 (15). Par contre, on observe la présence d'une fraction très lente (mobilité 2,4) qui n'existe pas dans la protéose de lait de vache.

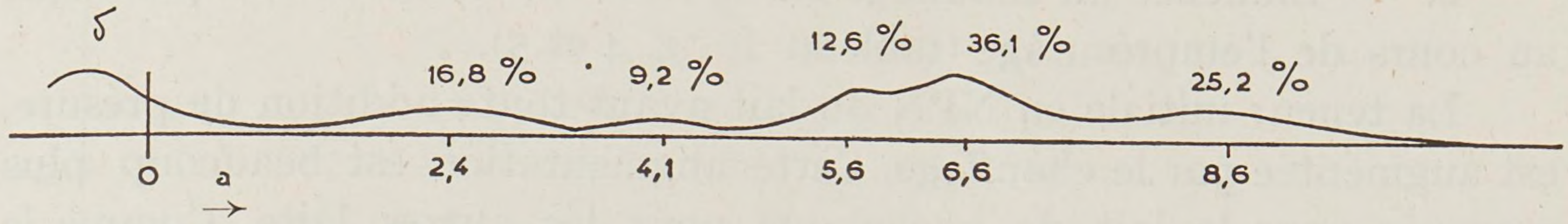


FIG. 3. — Diagramme d'électrophorese de la protéose de lait de brebis. — Tampon Véronal-Véronal sodique pH = 8,6. — force ionique = 0,1. — Conductibilité tampon = 0,00317. — I = 20 mA. — E = 250 volts. — Gradient de potentiel = 8,3 volts/cm. — Temps = 7 000 secondes. — Concentration = 0,9 p. 100.

Dans l'ensemble la protéose de lait de brebis, obtenue dans les conditions décrites, se présente sous un aspect aussi hétérogène que la protéose de vache.

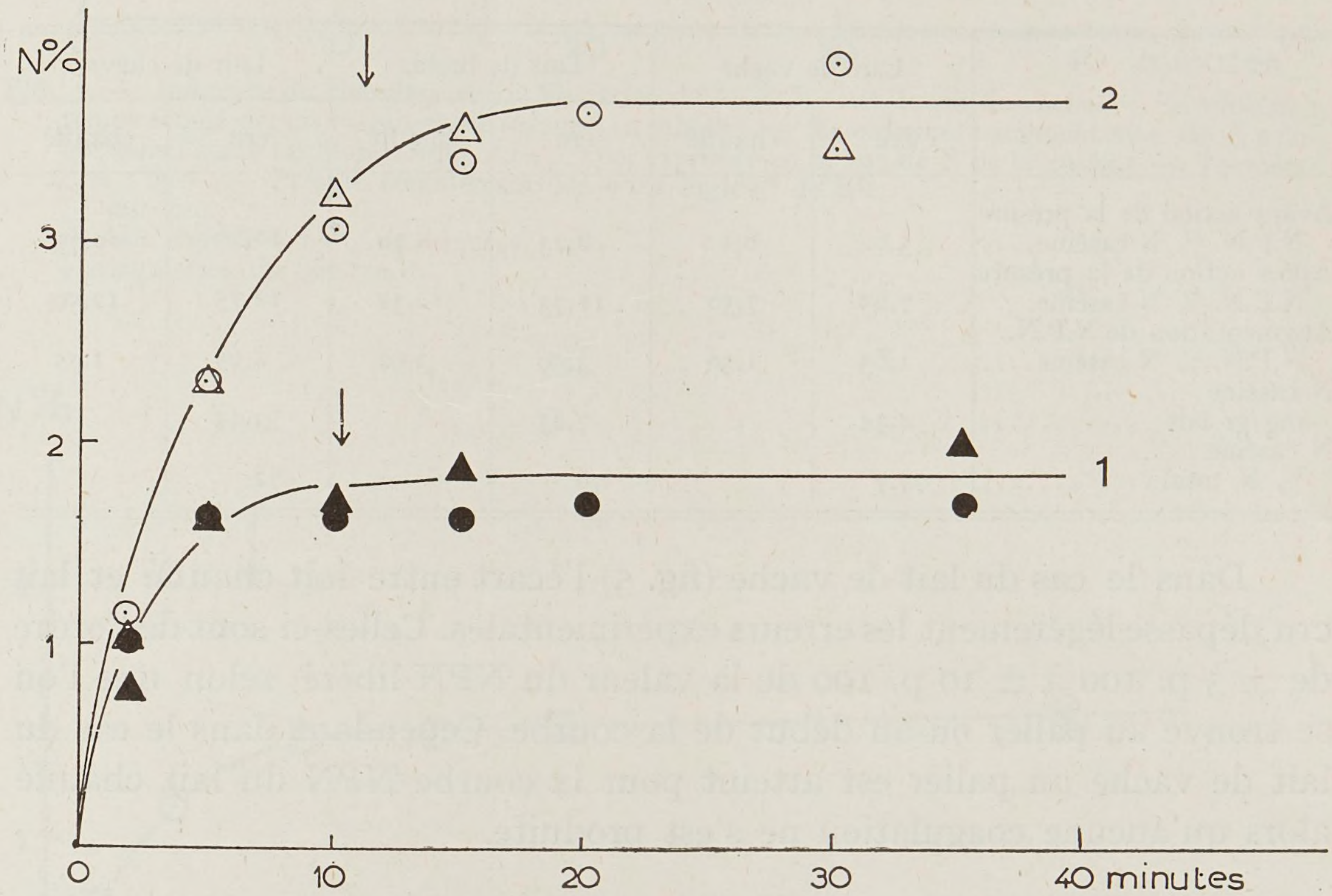


FIG. 4. — Influence du chauffage sur la libération du N. P. N. — *En abscisse* : temps écoulé depuis l'addition de présure, en minutes. — *En ordonnée* : augmentation de N soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100, exprimée en p. 100 de N de la caséine. — Température : 25°C. — Présure commerciale : e = 0,1 mg/cm³ de lait.
△ lait cru.
⊙ lait chauffé à 95°C 15 minutes.
↓ coagulation.
1 lait de chèvre.
2 lait de brebis.

b) Laits chauffés et non chauffés.

1. — Influence du chauffage sur le temps de coagulation.

Le lait de vache cru dont le temps de coagulation était de 10 minutes à 25 °C ne coagule pas après une heure d'incubation avec la présure lors-

qu'il a été préalablement chauffé dans les conditions décrites plus haut. Par contre, le temps de coagulation des laits de brebis et de chèvre est peu modifié par le même chauffage : il augmente d'environ 10 p. 100.

2. — Influence du chauffage sur la libération d'azote non protéique au cours de l'emprésurage (tableau I, fig. 4 et 5).

La teneur initiale en NPN du lait avant toute addition de présure, est augmentée par le chauffage. Cette augmentation est beaucoup plus marquée pour le lait de vache que pour les autres laits. Comme le montre la figure 4 la libération du NPN en fonction du temps d'empré-surage n'est pas affectée d'une façon appréciable par le chauffage préalable des laits de brebis et de chèvre.

TABLEAU I

Teneur en NPN des laits de vache — brebis — chèvre.

	Lait de vache		Lait de brebis		Lait de chèvre	
	cru	chauffé	cru	chauffé	cru	chauffé
Avant action de la présure N.P.N. % N caséine....	5,62	6,11	8,23	8,40	10,70	10,75
Après action de la présure N.P.N. % N caséine....	7,25	7,50	11,73	12,32	12,75	12,50
Augmentation de N.P.N. N.P.N. % N caséine....	1,63	1,39	3,50	3,92	2,05	1,75
N caséine mg/gr lait	4,34		7,23		3,43	
N caséine % N total	77,7		76		72	

Dans le cas du lait de vache (fig. 5) l'écart entre lait chauffé et lait cru dépasse légèrement les erreurs expérimentales. Celles-ci sont de l'ordre de ± 5 p. 100 à ± 10 p. 100 de la valeur du NPN libéré, selon que l'on se trouve au palier ou au début de la courbe. Cependant dans le cas du lait de vache un palier est atteint pour la courbe NPN du lait chauffé alors qu'aucune coagulation ne s'est produite.

c) Laits de vaches à coagulation lente ou rapide.

Les durées de coagulation de ces deux sortes de laits (« lent » ou « rapide ») ont été exprimées en pour cent de la durée de coagulation du lait de mélange utilisé comme lait de référence ; dans ces conditions le lait « rapide » sur lequel nous avons expérimenté avait, à 25°C, une durée de coagulation égale à 30 et le lait « lent » une durée de coagulation supé-rieure à 500. A 37,5 °C l'écart entre les deux laits « lent » et « rapide » était bien moindre : respectivement 69 et 156.

Le lait « lent » utilisé provenait d'une mamelle bactériologiquement saine. Son pH était de 6,4.

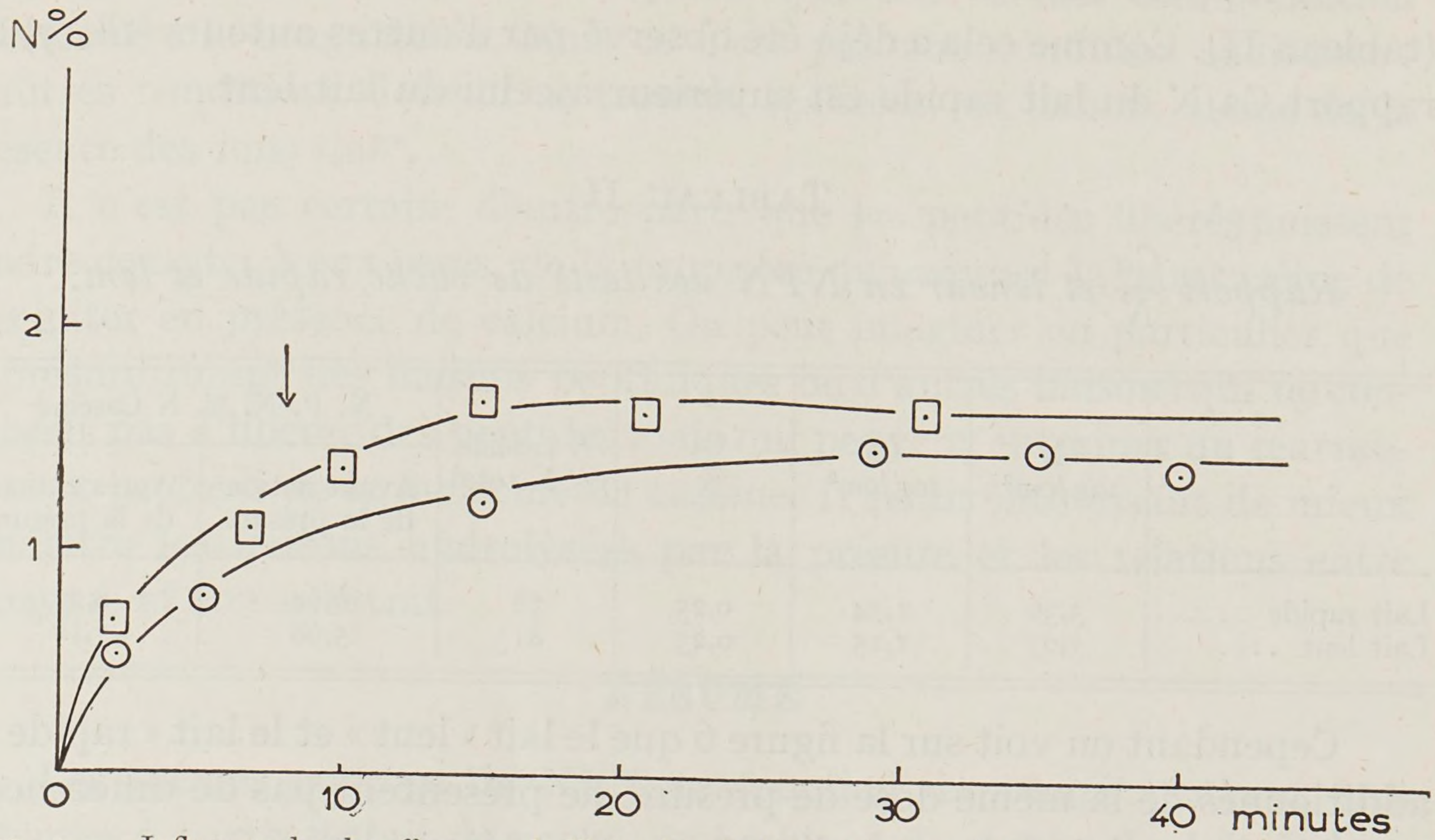


FIG. 5. — Influence du chauffage sur la libération du N. P. N. dans le lait de vache. — *En abscisse* : temps écoulé depuis l'addition de présure, en minutes. — *En ordonnée* : augmentation de N soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100, exprimée en p. 100 de N de la caséine. — Température : 25°C. — Présure commerciale : $e = 0,1$ mg/cm³ de lait.
⊡ lait cru.
⊙ lait chauffé à 95°C 15 minutes.
↓ coagulation du lait cru.

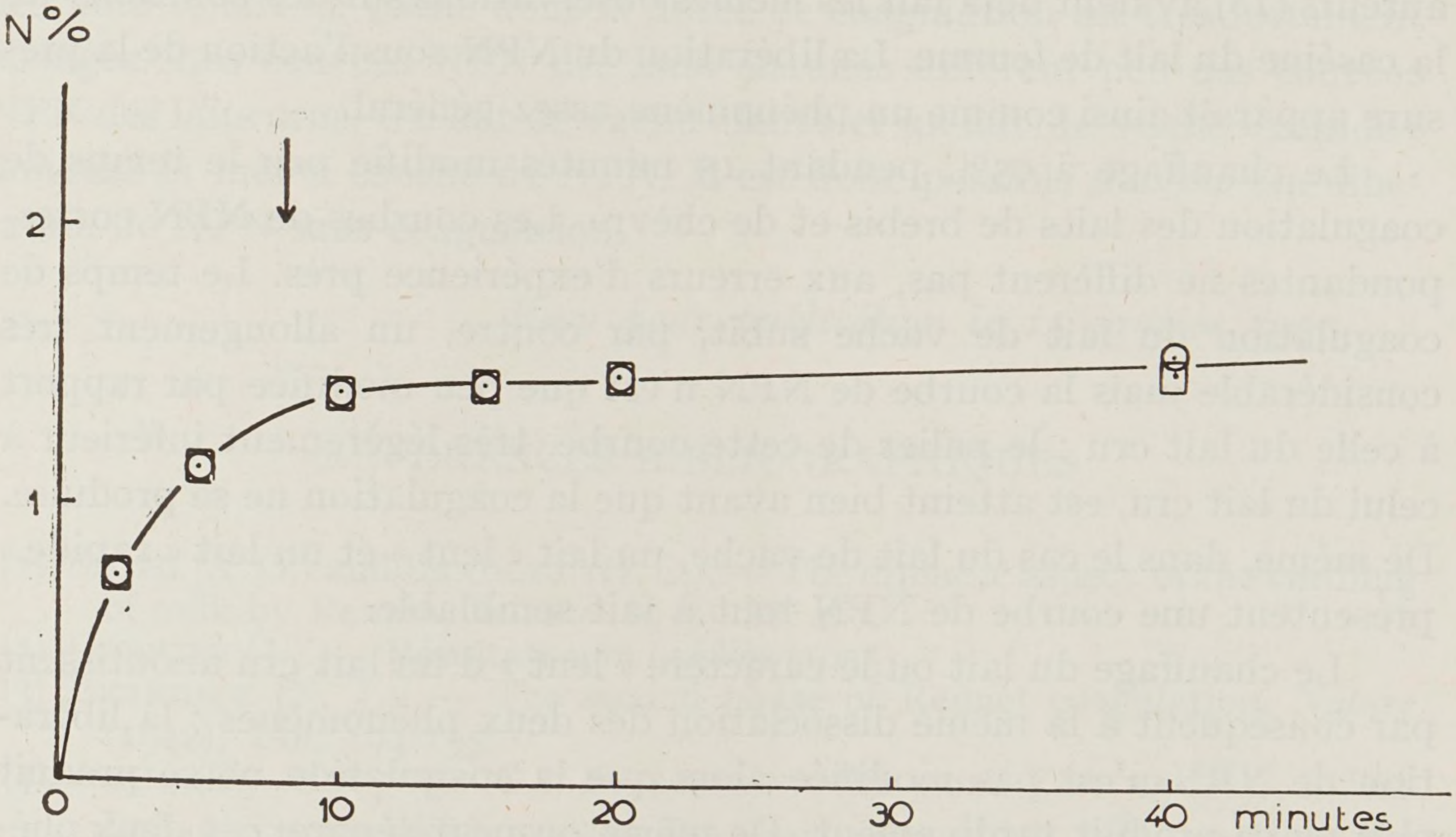


FIG. 6. — Influence du caractère lent et rapide sur la libération du N. P. N. dans le lait de vache. — *En abscisse* : temps écoulé depuis l'addition de présure, en minutes. — *En ordonnée* : augmentation de N soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100 exprimée en p. 100 de N de la caséine. — Température : 25°C. — Présure commerciale : $e = 0,2$ mg/cm³ de lait.
⊡ lait lent.
⊙ lait rapide.
↓ coagulation du lait rapide.

Le rapport Ca/N a été déterminé pour les deux échantillons de lait (tableau II). Comme cela a déjà été observé par d'autres auteurs (16,17) le rapport Ca/N du lait rapide est supérieur à celui du lait lent.

TABLEAU II

Rapport $\frac{Ca}{N}$ et teneur en NPN des laits de vache rapide et lent.

	N mg/cm³	Ca mg/cm³	$\frac{Ca}{N}$	N caséine % N total	N. P. N. % N Caséine — Avant action de la présure	N. P. N. % N Caséine — Après action de la présure
Lait rapide	5,36	1,34	0,25	78	6,64	8,21
Lait lent	5,03	1,15	0,23	81	5,68	7,18

Cependant on voit sur la figure 6 que le lait « lent » et le lait « rapide », additionnés de la même dose de présure, ne présentent pas de différences sensibles au point de vue de l'azote non protéique libéré.

IV. — DISCUSSION

La forme de la courbe de NPN en fonction du temps est pratiquement la même pour les laits de vache, de brebis et de chèvre. D'autres auteurs (18) avaient déjà fait les mêmes observations sur des solutions de la caséine du lait de femme. La libération du NPN sous l'action de la présure apparaît ainsi comme un phénomène assez général.

Le chauffage à 95°C pendant 15 minutes modifie peu le temps de coagulation des laits de brebis et de chèvre. Les courbes de NPN correspondantes ne diffèrent pas, aux erreurs d'expérience près. Le temps de coagulation du lait de vache subit, par contre, un allongement très considérable mais la courbe de NPN n'est que peu modifiée par rapport à celle du lait cru : le palier de cette courbe, très légèrement inférieur à celui du lait cru, est atteint bien avant que la coagulation ne se produise. De même, dans le cas du lait de vache, un lait « lent » et un lait « rapide » présentent une courbe de NPN tout à fait semblable.

Le chauffage du lait ou le caractère « lent » d'un lait cru aboutissent par conséquent à la même dissociation des deux phénomènes : la libération de NPN n'est pas modifiée alors que la coagulation ne se produit plus ou se produit tardivement. De même on peut séparer ces deux phénomènes en faisant agir la présure sur des solutions de caséinate en l'absence d'ions calcium. On peut aussi utiliser l'écart important de leurs coefficients de température : en effet, un lait maintenu à 0°C ne coagule pas avant 4 jours alors que le palier de la courbe de NPN est atteint au bout de 2 heures (4).

Cependant comme il n'a pas été observé de coagulation par la pré-

sure sans libération de NPN il semble que celle-ci soit une condition nécessaire à la coagulation. Mais ce n'est pas une condition suffisante : d'autres conditions doivent se trouver réalisées, en dehors même de la présence des ions Ca^{++}.

Il n'est pas certain, d'autre part, que les peptides libérés puissent rendre compte, à eux seuls, de la propriété qu'acquiert la paracaséine de précipiter en présence de calcium. On peut imaginer en particulier que la présure rompt des liaisons peptidiques ou d'autres liaisons qui ne conduisent pas à libérer des peptides mais qui peuvent entraîner un réarrangement profond de la molécule de caséine. Il serait intéressant de mieux connaître les liaisons hydrolysées par la présure et les relations entre l'enzyme et son substrat.

RÉSUMÉ

Les mêmes courbes de NPN en fonction du temps peuvent être obtenues à partir de lait de vache, de brebis et de chèvre. Le lait de brebis et le caséinate préparé à partir de ce lait présentent la particularité d'avoir plus de NPN soluble dans 12 p. 100 d'acide trichloracétique que les deux autres laits (vache et chèvre).

Un chauffage à 95°C pendant 15 minutes modifie peu le temps de coagulation des laits de brebis et de chèvre, contrairement à ce qui a lieu pour le lait de vache dont la durée de coagulation est très fortement allongée. Les courbes NPN des laits chauffés diffèrent peu des courbes NPN des laits crus. Un lait de vache « lent » et un lait de vache « rapide » donnent la même courbe de NPN. Il est donc possible d'avoir une libération de NPN sans coagulation.

Reçu pour publication le 15 *janvier* 1957.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) SMITH (A. G.) and BRADLEY (H. C.). — The diphasic aspect of the curdling of milk by Rennin. *Science* (1935), **82**, 467.
(2) GARNIER (J.). — Résultats non publiés (1955).
(3) BERRIDGE (N. J.). — The second phase of Rennet coagulation. *Nature* (1942), **149**, 194-195.
(4) ALAIS (C.), MOCQUOT (G.), NITSCHMANN (Hs.) und ZAHLER (P.). — Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch. VII. — Über die Abspaltung von Nicht-Protein-Stickstoff (N. P. N.) aus Casein durch Lab und ihre Beziehung zur Primärreaktion der Labgerinnung der Milch. *Helv. Chim. Acta* (1953), **36**, 1955-1968.
(5) NITSCHMANN (Hs.) und VARIN (R.). — Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch. IV. — Die Proteolyse des Caseins durch Kristallisiertes Lab. *Helv. Chim. Acta* (1951), **34**, 1421-1430.
(6) MATTENHEIMER (H.) und NITSCHMANN (Hs.). — Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch. VIII. — Die Abspaltung von Nicht-

Protein-Stickstoff (N. P. N.) aus Casein durch verschiedene proteolytische Fermente, verglichen mit der Abspaltung durch Lab. *Helv. Chim. Acta* (1955), **38**, 687-698.

(7) NITSCHMANN (Hs.) und KELLER (W.). — Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch. IX. — Über die Abspaltung von Nitch-Protein-Stickstoff (N. P. N.) aus isoliertem α und β Casein durch Lab. *Helv. Chim. Acta* (1955), **38**, 942-946.

(8) CHERBULIEZ (E.) et BAUDET (P.). — Recherches sur la Caséine. VI. — Transformation de la caséine en paracaséine. *Helv. Chim. Acta* (1950), **33**,, 1673-1688.

(9) LORAND (L.). — Fibrino-peptide. *Biochem. J.*, (1952), **52**, 200-203.

(10) FERRY (J. D.), KATZ (S.) and TINOCO (I.). — Some aspects of Polymerization of fibrinogen. *J. of Polym. Sci.*, (1954), **12**, 509-516.

(11) Symposium of chemistry of prothrombine and fibrinogen. *Physiolog. Rev.* (1954), **34**, 711-760.

(12) ALAIS (C.). — Préparation de présure cristallisée à partir d'estomacs de veaux (caillettes). *Ann. Techn.*, (1955), **1**, 113-120.

(13) ROWLAND (S. J.). — The soluble protein fraction of milk. *J. of Dairy Res.*, (1937), **8**, 6-14.

(14) ROWLAND (S. J.). — The determination of the nitrogen distribution in milk. *J. of Dairy Res.*, (1938), **9**, 42-46.

(15) ALAIS (C.). — Étude des substances azotées non-protéiques (N. P. N.) séparées de la caséine du lait de vache sous l'action de la présure. XIV[e] Congr. Intern. sur le lait et ses dérivés. Rome, II, **2**, 823-838, (1956).

(16) VILEGZHANIN (M. Z.). — Vyysnenie Prichiny Sychuzhnoy Vyalosti Moloka. *Proc., Vologda Agric. Inst.* (1942), **5**, 275-309.

(17) CHEVALIER (R.), MOCQUOT (G.), ALAIS (C.) et BONNAT (M.). — Relation entre la composition du phosphocaséinate de calcium et l'aptitude du lait à coaguler par la présure. *Comptes rendus Ac. Sci.* (1950), 231, 241-251.

(18) NITSCHMANN (Hs.) und KELLER (W.). — Dissertation W. KELLER : Die Abspaltung von Peptiden aus reinen Casein fraktionen durch kristallisiertes Lab. Bern 1954.

LOCALISATION ET ÉVOLUTION DE LA VITAMINE B_1 DANS LE RAISIN, AU COURS DE LA MATURATION

PAR

Mlle A. OURNAC et M. FLANZY
Station centrale de Technologie végétale, Narbonne.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Travaux antérieurs.

II. — Travaux personnels.

A. — Choix d'une méthode de dosage.
- — Méthode biochimique (étude de la méthode et résultats obtenus.
- — Méthode chimique (étude de la méthode et résultats obtenus).
- — Comparaison des deux méthodes appliquées au jus de raisin.

B. — Localisation et évolution de la vitamine B_1. du raisin au cours de la maturation.
- — Technique opératoire.
- — Résultats.
- — Discussion des résultats.

Conclusion.

I. — TRAVAUX ANTÉRIEURS

On connaît l'activité biologique de la vitamine B_1 ou thiamine. Elle est indispensable à l'homme dont la ration journalière est fixée aux environs de 750 γ. Etant donné son importance, elle a été le sujet d'un certain nombre d'études dans le cas du raisin et de ses dérivés.

M[me] RANDOIN en 1928 (1) recherche la valeur vitaminique du jus de raisin et conclut ainsi : le jus de raisin frais ne renferme que peu de vitamine B_1 antinévritique. La pulpe et les pépins en contiendraient encore moins ou pas du tout.

En 1938 (2) elle aboutit aux résultats suivants :

La pulpe des raisins blancs ou noirs semble un peu plus riche en vitamine B_1 que le raisin entier, tandis que la peau semble, au contraire, plus pauvre. Le jus des raisins blancs ou noirs aurait sensiblement la même teneur en vitamine B_1 que la pulpe.

Toutes ces recherches ont été effectuées par une méthode biologique à l'aide du pigeon.

MORGAN, NOBLES, WIENS, MARSH, et WINKLER (3) en 1938, ont étudié l'influence de certains traitements sur les vitamines du groupe B contenues dans les jus et les vins de raisins de Californie. Voici leurs résultats concernant la teneur en vitamine B_1 du jus frais :

Muscat	300 à 360 γ/litre
Zinfandel	300 à 420 γ/litre
Tokay	300 γ/litre
Palomino	120 γ/litre
Alicante	320 γ/litre

La vitamine a été dosée par la méthode de croissance du rat.

FLAVIER et GENEVOIS en 1939, après avoir étudié une méthode de dosage des vitamines B_1 et B_2 applicable aux tissus végétaux (4) suivent l'évolution de ces vitamines au cours de la maturation du raisin et de la fermentation alcoolique (5).

Ils dosent la thiamine chimiquement par formation de thiochrome, ils évaluent la fluorescence des essais par comparaison avec celle de solutions étalons de vitamine B_1 traitées dans les mêmes conditions.

D'après eux :

— les raisins verts sont relativement riches en B_1, 0,5 à 0,8 mg par kg de grains ;

— les raisins mûrs contiennent un peu moins de B_1, 0,2 à 0,4 mg par kg.

DAMRAU, FERGUSON et LESSER en 1943 (6) pensent qu'il existe un rapport très favorable dans le jus de raisin entre les sucres et la vitamine B_1, ce qui lui conférerait une valeur énergétique remarquable. Ces auteurs font travailler un certain nombre d'individus sur une bicyclette ergométrique. Ils comparent les travaux fournis dans les mêmes conditions, par les mêmes sujets, à l'état normal d'une part et après ingestion d'une certaine quantité de jus de raisin d'autre part (280 cm³ en moyenne). Les résultats moyens s'établissent ainsi en watts-minute.

Contrôle	Après ingestion du jus	Différence	% d'augmentation
203,47	248,75	+ 45,28	26,22

L'endurance physique, aussi bien que le travail fourni, sont notablement accrus à la suite de l'absorption du jus.

LAVOLLAY et PATRON (7), en relatant ce travail, ont calculé le nombre de calories fournies par le jus et l'ont comparé au nombre de calories correspondant au travail supplémentaire des sujets : le supplément de travail moyen correspond à 652 calories ; or les 280 cm³ de jus de rasin, renfermant 17 p. 100 de sucre, c'est-à-dire, en tout 43,6 g d'hexoses, ne peuvent guère fournir plus de 190 calories. Il y a production d'un travail bien supérieur à celui correspondant au sucre ingéré.

LAVOLLAY et PATRON (8) publient en 1947 un tableau dans lequel figure la teneur en toutes les vitamines d'un certain nombre de fruits, de leur jus frais et conservé.

Voici les chiffres de thiamine relatifs au raisin :

Fruit entier	90 γ pour 100 g
Jus frais	12 à 57 γ pour 100 g

Les constituants solides renfermeraient donc de la thiamine.

SCHANDERL (9) en 1950, dans une étude sur la microbiologie des vins, effectue des dosages de vitamine B_1, basés sur la croissance du phycomyces, méthode proposée par SCHOPFER. Il aboutit aux résultats suivants :

Le moût de raisin tel qu'il sort du pressoir renferme de 120 à 200 γ de thiamine par litre, il est plus riche que le jus filtré et pasteurisé dans lequel il trouve seulement 27γ par litre.

Le vin rouge (133 à 266 /γlitre) contient plus de thiamine que le vin blanc (13 à 150 γ/litre). Cela provient du fait que le vin rouge subit une fermentation et une macération où il reste longtemps en contact avec les pellicules et les pépins qui contiennent sensiblement plus de thiamine que le jus et la pulpe.

Les travaux des auteurs russes présentent sur la teneur du raisin en vitamine B_1 des résultats assez variables :

SISSAKIAN, EGOROV et SAAKIAN, en 1950 (10) donnent les doses suivantes pour des moûts de raisins blancs destinés à la fabrication de vins de Xérès :

Dans le moût de raisin mûr.

Cépage	Thiamine γ/litre	Sucre p. 100	Ac. Totale p. 100 (acide tartrique)
Voskéat	175,5	23,8	4,8
Tchilar	266,8	24,5	4,7

BOUKINE en 1951 (11) ne trouve que des traces de thiamine dans le raisin.

D'après le tableau que rapporte NEGROUL en 1952 (12), dans lequel se trouvent groupés tous les constituants du raisin, il y aurait de 0,25 à 1,25 mg de thiamine dans 100 g de raisin frais.

Les dosages ont été partout réalisés par la méthode au thiochrome.

HALL, BRINNER, AMERINE et MORGAN en 1956 (13) en utilisant la méthode au thiochrome, déterminent la vitamine B_1 contenue dans le raisin, le jus et le vin.

Au cours de l'extraction du jus, ils constatent une perte de thiamine de 3 à 23 p. 100.

Cépage	γ B_1 pour 100 g de fruit	γ B_1 pour 100 cm^3 de jus frais
Palomino 1953	38	29
Riesling blanc 1953	39	38
Riesling blanc 1954	47	36
Tinta Madeira 1954	58	51
Xérès 1953	50	44
Zinfandel 1953	38	31

II. — TRAVAUX PERSONNELS

A la suite de ces travaux, il nous a paru intéressant de préciser, pour quelques cépages méridionaux, d'une part, les teneurs en vitamine B_1 des différentes parties constitutives du fruit, d'autre part, la variation au cours de l'évolution de la baie (maturation) de cette vitamine.

Les résultats pourront contribuer à fixer la valeur vitaminique B_1 du raisin entier et de ses constituants et à déterminer la place que tient ce fruit parmi les autres aliments au point de vue apport en cette vitamine.

Cette étude permettra peut-être d'expliquer, tout au moins en partie, par la présence de doses variables de thiamine, les vitesses différentes des fermentations viniques selon qu'elles s'effectuent :

— Sur le jus de goutte, constitué uniquement par le suc vacuolaire des cellules de la pulpe.

— Sur la vendange entière, plus ou moins écrasée (présence des pellicules et de la pulpe).

— A différentes époques de la maturation.

Nous avons d'abord choisi une méthode de dosage de la thiamine applicable à notre cas.

A. — CHOIX D'UNE MÉTHODE DE DOSAGE DE LA THIAMINE

En 1941, JACQUOT, ARMAND et REY (14) ont donné un exposé d'ensemble très complet des différents moyens de doser la thiamine. Ils exposent pour chaque catégorie de méthodes, le principe, les techniques employées, les conditions d'utilisation, les avantages et les inconvénients.

La deuxième partie de leur ouvrage est consacrée à leurs travaux personnels, ils ont exécuté des dosages de thiamine avec plusieurs méthodes, ils nous font part des précautions opératoires à prendre et des modifications qu'ils ont été amenés à formuler. A la suite de cet exposé, nous avons retenu deux méthodes, une biochimique, l'autre chimique.

Méthode biochimique.

Dès 1936, PETERS puis SHERMAN et ELVEHJEM avaient signalé que la vitamine B_1 accélérait la fermentation alcoolique. Mais c'est à SCHULTZ,

Atkin et Frey que revient le mérite d'avoir utilisé cette propriété pour établir un test quantitatif.

Le principe de leur méthode est le suivant :

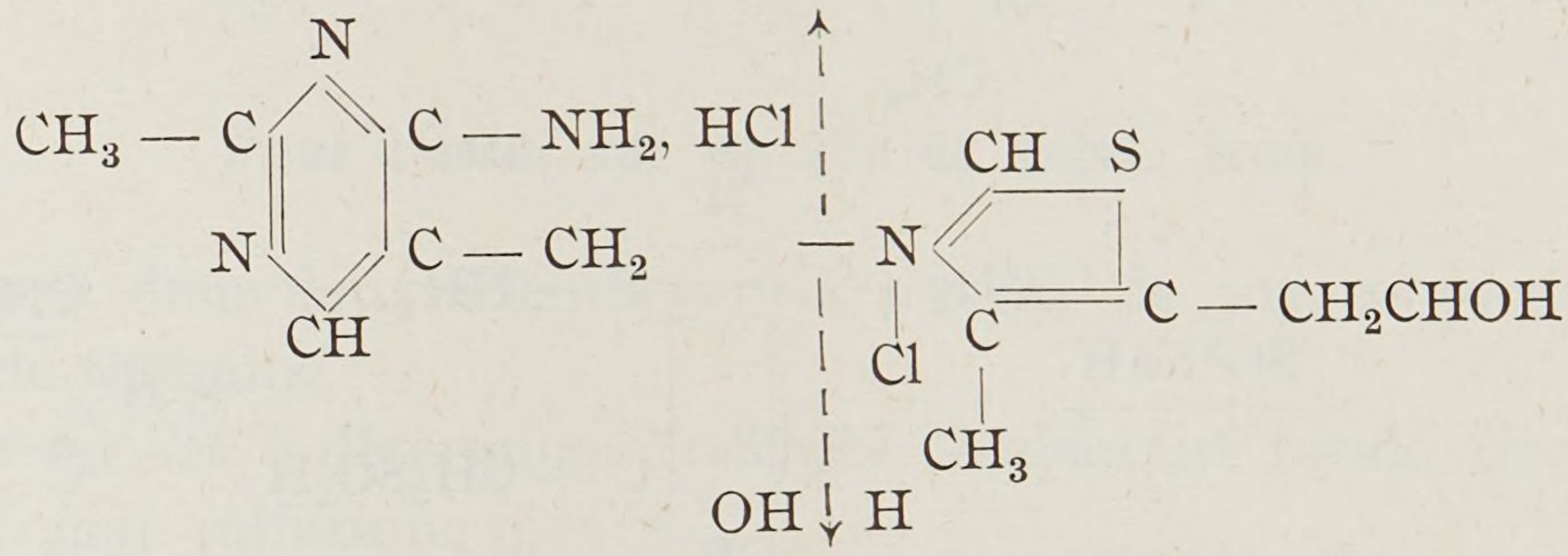
— Dans certaines conditions, la relation entre la stimulation de la fermentation et la quantité de thiamine présente est approximativement linéaire. Ils déterminent la vitesse d'une fermentation par mesure du gaz carbonique produit pendant l'unité de temps.

Pour obtenir quantitativement les dégagements de gaz carbonique liés à la seule fermentation ils travaillent en atmosphère d'azote et utilisent des levures de boulangerie.

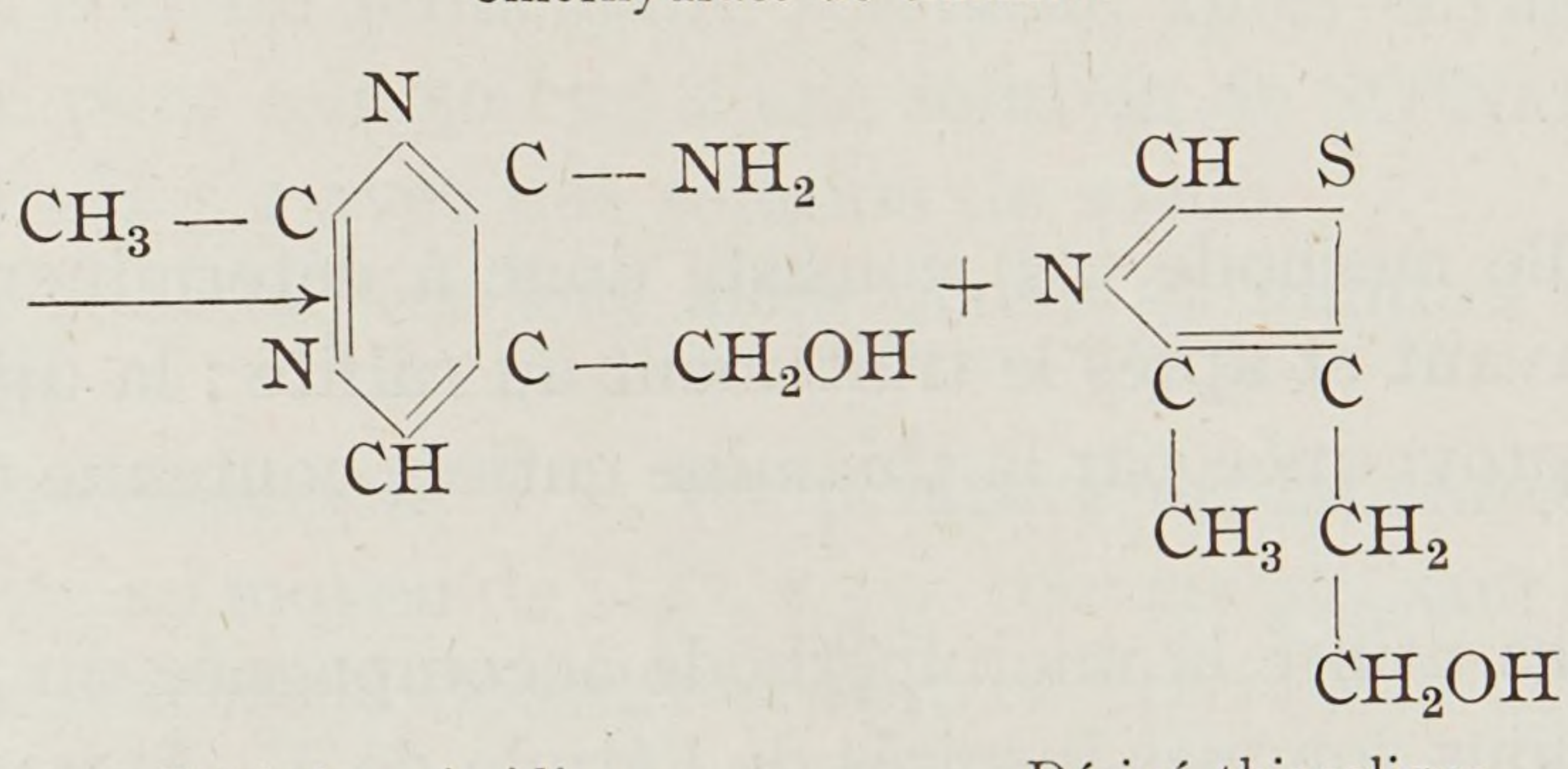
En 1937 (15), (16) ils publient une macrométhode permettant de doser de 0,5 à 4 γ de thiamine.

En 1939 (17) ils fixent les conditions d'une microméthode qui permet de déterminer des doses de vitamine de l'ordre du mγ. Ils utilisent un appareil de Warburg et le dégagement gazeux est proportionnel à la quantité de thiamine mise en jeu pour des prises d'essai renfermant de 5 à 25 mλ.

Entre temps (18) ces auteurs se sont heurtés à des difficultés : la levure autoclavée (privée de B_1) et la thiamine détruite par ébullition alcaline demeurent des accélérateurs efficaces de la fermentation. Dans ces conditions, une partie de l'effet stimulant n'est pas dû au facteur B_1. Ils ont alors établi que : des deux produits d'hydrolyse de la thiamine, le dérivé pyrimidique (2 méthyl 5 hydroxyméthyl 6 aminopyrimidine) stimule très activement la fermentation, le dérivé thiazolique est sans effet.



Chlorhydrate de thiamine



Dérivé pyrimidique Dérivé thiazolique

Pour différencier l'action de la vitamine intacte de celle de ces produits de dédoublement présents dans le milieu, les auteurs on proposé deux modifications :

1° Oxydation différentielle de l'aneurine en présence d'aminopyrimidine (19) ; (20). Traitée à froid par le ferricyanure alcalin, l'aneurine se transforme en thiochrome, alors que l'aminopyrimidine, plus résistante à l'oxydation, demeure intacte. Le thiochrome est sans effet sur la fermentation. Lorsque l'on a observé un effet stimulant, il suffit donc de traiter la substance à doser par le ferricyanure alcalin, la différence des deux essais correspond à la thiamine vraie.

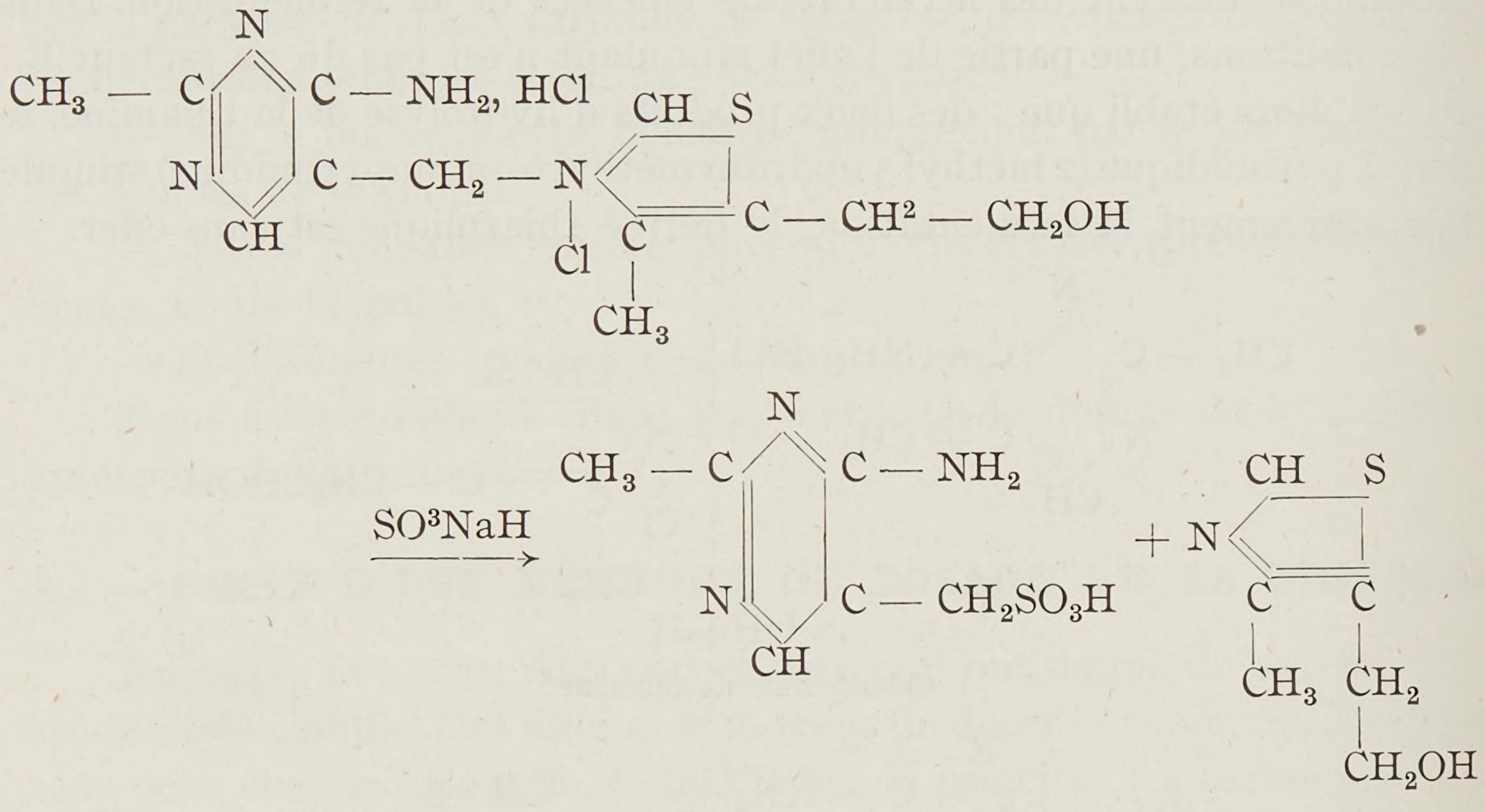
2° Traitement par les sulfites. Ce sont les travaux de Williams et Spies (21) sur le clivage de la thiamine par les sulfites, qui ont suggéré une modification à la méthode par fermentation.

Ils ont établi que dans certaines conditions de pH, de température et de concentration, la thiamine est quantitativement clivée par les sulfites en deux corps : l'acide 2-méthyl, 6-aminopyrimidine, 5-méthyl sulfonique et le 4 méthyl 5-(β hydroxy) éthylthiazole.

En 1941, Schultz, Atkin, Frey et Williams (22) ont montré que :

— Ces deux corps n'ont aucune action sur la fermentation.

— L'interférence du dérivé pyrimidique d'hydrolyse de la B_1 n'est pas altérée par ce traitement.



La nouvelle méthode (23) consiste donc à déterminer la vitesse de fermentation avant et après le traitement au sulfite : la différence représente l'action provoquée par la thiamine entière contenue dans la préparation.

Nous avons utilisé la microméthode accompagnée du traitement au sulfite. Nous nous sommes inspirés de l'étude de Y. Armand (24) sur la cinétique du processus fermentaire et sur les conditions expérimentales.

Dans un appareil de Warburg muni de flacons de 20 cm³ de capacité, on utilise comme milieu fermentaire, les solutions indiquées par Schultz, Atkin et Frey (17) : solution saline, solution tampon, solution azotée.

On prépare extemporanément le milieu fermentaire par mélange de ces solutions et addition de glucose.

Sur des pains de levures pressées de boulangerie aussi frais que possible, on prélève 2 g que l'on broie au mortier et dilue à 100 cm^3 avec de l'eau distillée juste avant utilisation. La suspension de levure ainsi obtenue renferme environ 200 millions de levure au cm^3.

Pour l'essai avec de la thiamine pure.

On introduit dans les flacons de l'appareil :
1 cm^3 de la solution fermentaire,
x cm^3 de la solution de thiamine pure,
(1-x) cm^3 d'eau distillée,
0,3 cm^3 de la suspension de levures.

Le volume total de liquide sera le même dans tous les flacons : 2,3 cm^3.

La fermentation s'effectue à pH = 5, pH pour lequel le gaz carbonique produit peut se dégager totalement.

Les flacons sont alors adaptés à leur manomètre et reçoivent pendant au moins 15 minutes un courant d'azote pur.

On maintient une légère surpression pendant 30 minutes.

On place les flacons dans le bain-marie de l'appareil réglé à 30°.

Les mesures utiles sont effectuées à partir de la 4e heure.

On mesure le gaz dégagé pendant 10 minutes à 5 minutes d'intervalle.

Pour l'essai sur un jus de raisin frais.

On met dans deux erlenmeyers 2 à 6 cm^3 de jus contenant entre 1 et 3 γ de thiamine :

L'un servira à déterminer l'activité fermentaire totale, on y ajoute 50 cm^3 d'acide sulfurique 0,15 N.

L'autre, l'activité fermentaire résiduelle après clivage aux sulfites.

On ajoute pour cela 50 cm^3 d'une solution de SO^3NaH à 0,6 p. 100 et on ajuste à pH 5,2 avec une solution de soude.

Les deux erlenmeyers sont alors placés 30 minutes dans un bain-marie bouillant.

Après refroidissement à la température du laboratoire on élimine l'excès de sulfite au moyen de H_2O_2 à 3 p. 100, en utilisant comme indicateur externe le réactif de BONNET et MAURY : ce réactif devient jaune en présence de H_2O_2 en excès. On dilue ensuite les deux solutions à 100 cm^3 en les ajustant à pH = 5 par addition lente de soude diluée.

Chaque dosage doit comporter au moins quatre déterminations :

— Activité fermentaire de deux doses de B_1 pure comprises entre 5 et 15 mγ.

— Activité fermentaire de x cm³ $\leqslant$ 1 de la solution traitée par SO_4H_2.

— Activité fermentaire de x cm³ $\leqslant$ 1 de la solution clivée.

Si le dégagement produit par 1 cm³ de la solution clivée est inférieur à celui de 5 mγ de thiamine pure, il faut utiliser x cm³ et ajouter (1-x) cm³ d'une solution de B_1 pure, renfermant de 5 à 15 mγ. Chaque flacon doit contenir 2,3 cm³ de liquide :

1 cm³ de solution nutritive.

0,3 cm³ de suspension de levure.

1 cm³ de la solution à doser convenablement diluée.

RÉSULTATS

A l'aide de cette méthode, nous avons trouvé dans des jus de raisin frais aussitôt après leur élaboration, des doses comprises entre 170 et 500 γ/litre.

Il existe dans chaque jus des doses variables de produits de clivage.

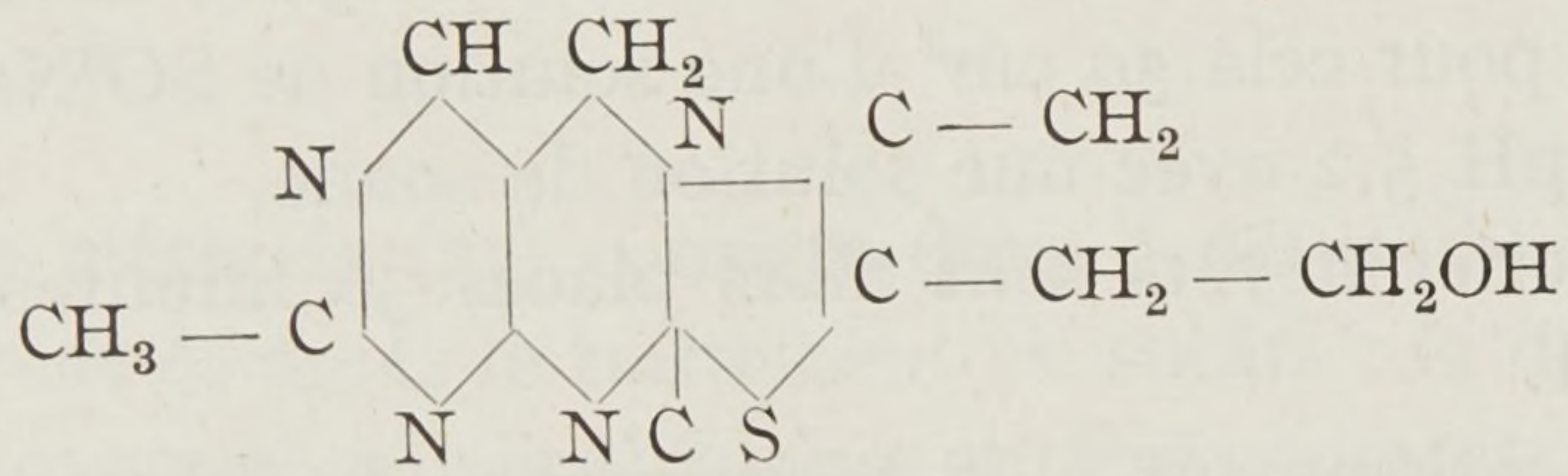
	Fermentation totale	Fermentation résiduelle	Thiamine vraie
	—	—	—
Aramon	330 γ/l	130 γ/l	200 γ/l
Carignan	540	200	340
Alicante	300	130	170
Morastel	575	200	375
Grenache blanc	850	350	500
Clairette	410	80	330

Nous avons trouvé cette méthode longue et délicate, aussi nous sommes-nous orientés vers la méthode chimique.

Méthode chimique.

Elle est basée sur le principe suivant dû à KUHN et ses collaborateurs.

L'oxydation de la thiamine par le ferricyanure alcalin conduit à un composé fluorescent en bleu appelé thiochrome.



Thiochrome

C'est JANSEN qui, le premier, en 1930 (25) fit de cette transformation en thiochrome suivie d'une mesure de fluorescence, une méthode quantitative.

Cette méthode a été ensuite étudiée et modifiée par divers auteurs, en particulier : CONNER et STRAUB (1941) (26). « The association of vitamin chemist » (1947) (27) et L. PETIT (1950) (28).

Voici les différentes opérations que nous effectuons et leur signification.

On extrait la thiamine à partir des matériaux solides par l'acide sulfurique à chaud.

Dans le cas où elle est présente sous forme d'ester phosphorique, le produit d'oxydation de cet ester est fluorescent mais n'est pas extrait comme l'est le thiochrome, par l'alcool isobutylique. On pratique alors une hydrolyse au moyen d'une phosphatase.

On purifie la solution obtenue par passage sur une zéolithe : decalso, suivie d'élution appropriée.

C'est dans cet éluat où la vitamine se trouve pratiquement isolée, qu'on l'oxyde par le ferricyanure alcalin et qu'on extrait le thiochrome formé par l'alcool isobutylique.

On mesure enfin l'intensité de la fluorescence émise par la couche alcoolique irradiée par rayonnement ultra-violet.

Pour chaque série de détermination, un essai témoin avec une solution standard de thiamine passée sur Decalso, éluée et oxydée est obligatoire. On ne peut pas utiliser de courbe établie à l'avance.

Voici maintenant comment nous avons procédé dans le cas du jus et des constituants solides du raisin :

Pour la préparation des échantillons.

50 ou 100 grains, selon la grosseur, sont pelés, puis écrasés au mortier en présence de sable de Fontainebleau, le jus est séparé de la pulpe par centrifugation.

On obtient ainsi séparément : le jus, la pulpe et la pellicule du fruit.

Pour l'extraction de la thiamine, des pellicules et de la pulpe.

Les pellicules et la pulpe sont broyées séparément avec 50 cm^3 d'acide sulfurique N/2 et portés 1 heure au bain-marie bouillant. On centrifuge et avec $SO_4H_2N/10$ on lave et on amène à un volume connu.

Hydrolyse enzymatique.

25 cm^3 de jus et 25 cm^3 de chaque liquide d'extraction sont amenés à pH = 4,5 au moyen d'acétate de Na 2,5 M, additionnés de 300 mg de phosphatase, laissés 2 heures au bain-marie à 45-50°, puis centrifugés. Nous utilisons comme phosphatase de la mylase P (WALLERSTEIN Laboratories New-York). Nous avons vérifié qu'elle ne renferme pas de thiamine et qu'elle agit quantitativement sur une dose connue de carboxylase pure.

Purification.

Les colonnes utilisées en forme de tulipes sont représentées sur la figure n° 1.

Le decalso est calibré et activé selon les indications données par « The association of vitamin chemist » (27). Chaque colonne reçoit 2 g de decalso sec et est remplie d'eau par aspiration pour éviter la formation de bulles d'air qui affaibliraient le pouvoir absorbant de la zéolithe. L'absorption doit se produire à pH = 4,7 et la prise d'essai doit contenir de 3 à 8 γ de thiamine.

On verse alors les solutions précédemment hydrolysées dans les réservoirs des tulipes et on laisse couler goutte à goutte, on règle le débit au moyen du robinet en verre.

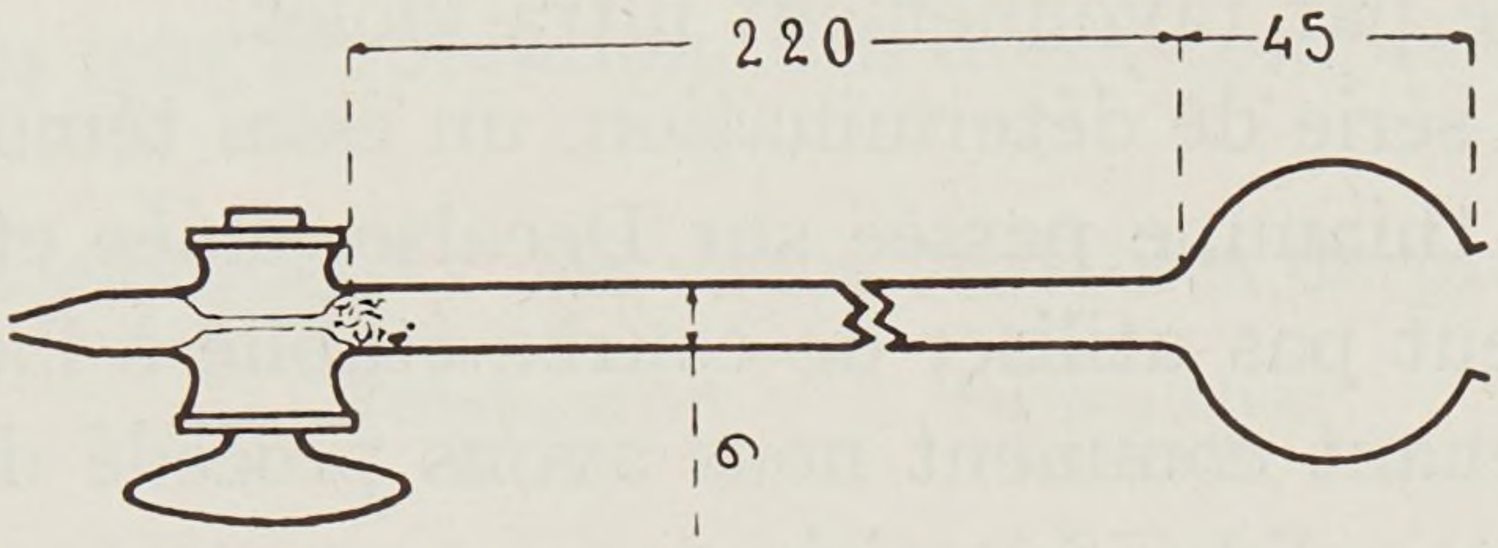


FIG. 1.

On lave trois fois avec 10 cm^3 d'eau chaude (60° environ) et on laisse écouler complètement l'eau du 3e lavage.

On élue alors avec 25 cm^3 d'une solution chaude de KCl acide (250 g KCl + 17 cm^3 ClH pur par litre). Cette solution est d'abord aspirée plusieurs fois avant d'être recueillie goutte à goutte dans une fiole jaugée de 25 cm^3.

On traite en même temps au décalso une solution de thiamine pure, préparée au moment de l'emploi de la façon suivante :

(A) 10 mg de thiamine dans 100 cm^3 d'eau.

(B) 5 cm^3 de (A) dilués à 100 cm^3 avec de l'eau.

(C) 4 cm^3 de (B) + 75 cm^3 de SO_4H_2(N/10) + 5 cm^3 d'acétate Na 2,5M sont amenés à 100 cm^3 avec de l'eau.

Cette dernière solution (C) se trouve à pH = 4,7 et contient 0,2 γ par cm^3.

On utilise 25 cm^3 de (C) renfermant 5 γ et on élue à 25 cm^3 avec KCl acide.

Oxydation.

Préparation de la solution oxydante :

— Ferricyanure de K à 2 p. 100.

— Soude à 50 p. 100.

On mélange extemporanément 1 cm^3 de la première à 9 cm^3 de la 2e.

Pour chaque essai (solution à doser et thiamine pure) on place dans deux tubes à centrifuger 5 cm³ d'extrait purifié.

Dans le premier tube, on ajoute 0,1 cm³ de la solution de soude, puis 15 cm³ d'alcool isobutylique (c'est l'essai à blanc).

Dans le deuxième tube, on ajoute 1 cm³ du mélange oxydant et 15 cm³ d'alcool.

On agite pendant 90 secondes, on centrifuge et on élimine la phase aqueuse.

Ces deux opérations : oxydation et séparation doivent être réalisées le plus rapidement possible. L'alcool isobutylique utilisé doit subir le traitement de purification suivant :

— On l'agite dans une ampoule à décantation avec une solution alcaline de ferricyanure.

— On le distille et on recueille la fraction passant entre 104 et 107°.

Mesure de la fluorescence.

Nous utilisons le spectrophotomètre Jobin et Yvon.

La source de lumière ultra-violette est constituée par une lampe à vapeur de mercure.

La longueur d'onde de la radiation excitatrice choisie est de 363 mµ. C'est pour cette longueur d'onde que l'intensité de la fluorescence émise a été trouvée maximum.

La longueur d'onde du rayonnement de fluorescence a été fixée par des auteurs autour de 475 mµ.

A la sortie de la cuve, on place un filtre destiné à éliminer les rayons ultra-violets diffusés par la solution. On a choisi le filtre Wratten nº 48.

La solution d'alcool isobutylique est examinée dans des cuves en quartz.

RÉSULTATS OBTENUS

Nous avons réalisé des dosages avec et sans emploi de mylase pour déterminer la forme (libre ou estérifiée) sous laquelle se trouve la vitamine B_1.

Dans les cas du jus et de la pulpe, les résultats des deux dosages sont identiques, la thiamine présente ne serait pas estérifiée.

Au contraire, dans le cas de la pellicule, l'emploi de la mylase augmente la dose de vitamine trouvée. Dans les pellicules du raisin, la thiamêine se trouverait en partie sous forme libre et en partie sous forme de cocarboxylase.

Les doses de thiamine trouvées dans le jus de raisin frais varient entre 100 et 300 γ/litre.

Cépage	γ/B_1 par litre de jus
Aramon	190
Carigan	240
Alicante	290
Terret blanc	122
Carignan blanc	163
Maccabeu	271
Servant	230
Cinsault	263

Comparaison des deux méthodes de dosage (biologique et chimique) appliquées au jus de raisin.

Le dosage chimique fournit des chiffres inférieurs à ceux obfenus par le dosage biologique.

Pour essayer d'expliquer cette différence, nous avons réalisé les essais suivants :

Nous avons déterminé par le Warburg l'acitvité fermentaire : de la solution obtenue après passage d'un jus sur decalso et lavage à l'eau d'une part, de l'éluat par KCl d'autre part.

Voici comment nous avons procédé :

On fait passer 20 cm^3 de jus sur une colonne de decalso.

On lave à l'eau et on réunit les liquides obtenus dans un ballon de 50 cm^3 (sol A).

On élue avec KCl acide (sol B).

On détermine sur ces deux solutions, après traitement approprié, l'intensité fermentaire totale et résiduelle.

Les résultats ont été les suivants :

Aramon jus frais.

1° Dosage au thiochrome : 130 γ/litre.

2° Dosage par fermentation :

Jus naturel : 300 γ/litre.

Jus passé sur Decalso et lavé à l'eau (sol A.) : 100 γ/litre.

Eluat du jus passé sur Decalso (sol B.) 155 γ/litre.

Aramon jus conservé par SO_2.

Ici la B_1 a été détruite par l'anhydride sulfureux utilisé pour la conservation.

1° Dosage au thiochrome : 0 γ/litre.

2° Dosage par fermentation :

Jus naturel : 250 γ/litre.

Jus passé sur Decalso et lavé à l'eau (sol A.) : 220 γ/litre.

Eluat du jus passé sur Decalso (sol B) : 0 γ/litre.

On s'aperçoit alors :

1° Que la solution A, qui ne donne pas de thiochrome par oxydation, donc, qui ne contient pas de thiamine entière d'après le dosage chimique, en contient d'après le dosage biologique.

2° Les doses de thiamine trouvées dans l'éluat, soit par fermentation, soit par thiochrome, sont approximativement identiques.

Il semble donc que la méthode biologique soit influencée par des corps qui activent la fermentation alcoolique, ne sont pas altérés par le traitement au sulfite, mais ne sont pas de la thiamine vraie.

La méthode chimique nous paraît plus spécifique, plus précise, plus rapide, moins délicate à réaliser, aussi l'avons-nous adoptée pour notre étude sur la localisation de la thiamine dans le raisin au cours de la maturation.

B. — LOCALISATION ET ÉVOLUTION DE LA VITAMINE B_1 AU COURS DE LA MATURATION

Technique opératoire. — Nous avons choisi trois cépages rouges de plaine : Aramon, Carignan et Alicante bouschet qui constituent une grande partie de l'encépagement languedocien.

Les prélèvements étaient effectués tous les huit jours à la même heure. Ils ont débuté le 6 juillet.

La première semaine, une seule détermination a été effectuée. Les grains entiers étaient broyés et traités par SO_4H_2 au bain-marie.

A partir de la deuxième semaine, on exprimait le jus et on effectuait deux déterminations : l'une sur le jus, l'autre sur le résidu solide.

A partir de la huitième semaine, le dosage était réalisé comme nous l'avons décrit précédemment. On dosait séparément la thiamine dans le jus, la pulpe et les pellicules.

RÉSULTATS

Exprimés en γ de thiamine, ils sont réunis dans les tableaux n° I, II, III et représentés sur les graphiques n° 1 à 9.

Le tableau n° I et les courbes n° 1, 2 et 3 représentent les doses de sucre, acides, thiamine, rapportées au litre de jus.

Le tableau n° II et les courbes n° 4, 5 et 6 représentent les doses de B_1 rapportées à 100 grains, c'est-à-dire la valeur vitaminique relative de chaque élément.

Le tableau n° III et les courbes n° 7, 8 et 9 renferment les doses de vitamine rapportées à 100 g de matière fraîche, c'est-à-dire la valeur absolue des différents constituants.

On a ensuite calculé :

Le pourcentage de vitamine apporté par chaque élément du fruit (tableau n° IV) et courbes n° 10-11-12.

La quantité fournie par ces éléments au kg de fruit (tableau n° V) et au litre de jus (tableau n° VI).

D'après l'allure générale des courbes obtenues l'évolution de la vitamine B_1 dans le raisin au cours de la maturation suit celle du sucre et se divise en trois périodes :

Avant la véraison : période latente où la B_1 reste stationnaire, augmente très peu.

A partir de la véraison on assiste à un afflux de B_1 qui accompagne l'afflux du sucre. Cette période s'étale sur 3 semaines environ.

Après la véraison : la B_1 continue à augmenter, mais faiblement et tend à se stabiliser pour diminuer ensuite.

Nous allons examiner en détail les variations qui se produisent selon que l'on considère les résultats rapportés au litre de jus, à 100 grains et à 100 g de matière fraîche.

Résultats rapportés au litre de jus.

(Tableau I, courbes n° 1, 2, 3).

Jusqu'à la véraison la dose de B_1 au litre de jus reste à peu près constante. On constate même une légère diminution au cours de la première semaine, due à une dilution plus importante que l'apport de B_1. A partir de la véraison, qui débute le 6 août pour les trois cépages considérés, le jus s'enrichit en B_1 dans de grandes proportions. L'accumulation, très rapide, de la B_1 dans le jus suit l'accumulation, très rapide, du sucre pendant 4 semaines.

Après cette période les sucres continuent à augmenter rapidement tandis que la dose de B_1 dans le litre de jus augmente faiblement, se stabilise et paraît commencer à diminuer au début de la surmaturation.

Un mois après le début de la véraison, la variation de la teneur du jus en B_1 ne suit plus la variation de la teneur en sucre.

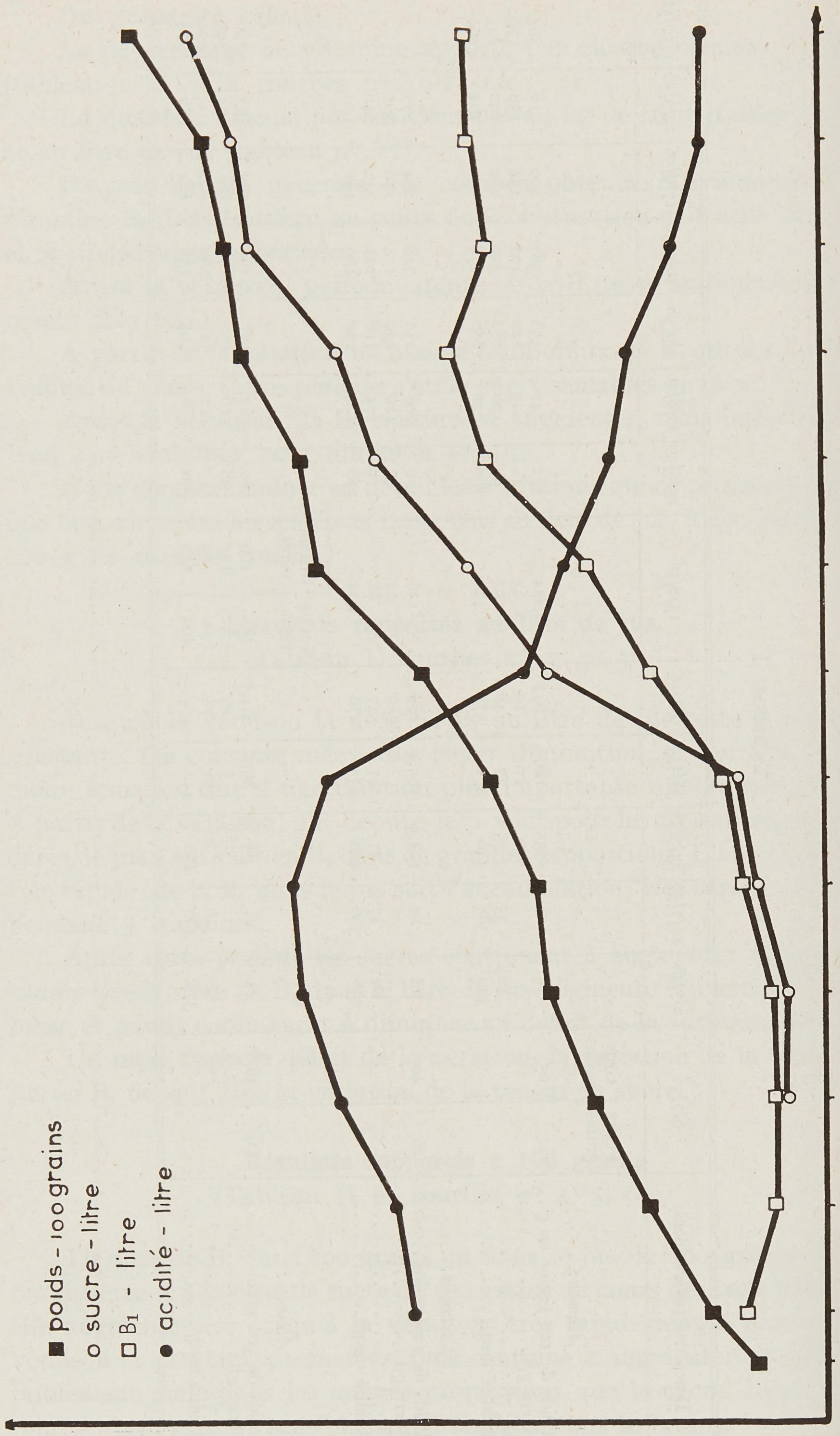
Résultats rapportés à 100 grains

(Tableau II et courbes n° 4, 5, 6).

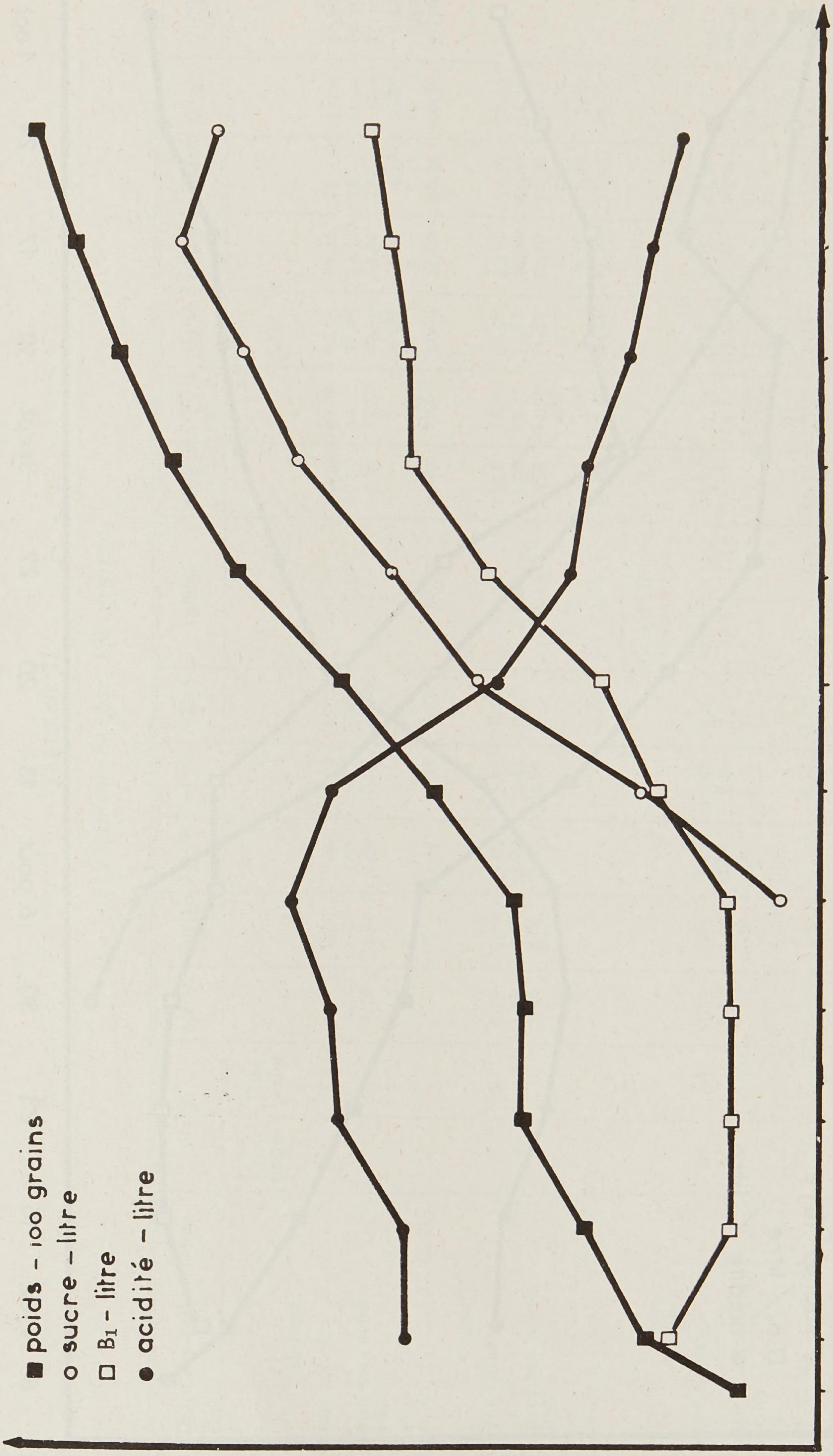
La dose de B_1 dans 100 grains ou dans le jus de 100 grains évolue parallèlement à la dose de sucre de 100 grains au cours des trois périodes : elle augmente peu jusqu'à la véraison, très rapidement à partir de la véraison et pendant 4 semaines, puis continue à augmenter un peu plus faiblement mais dans les mêmes proportions que le sucre. Les courbes représentatives sont sensiblement parallèles tout le temps.

TABLEAU I

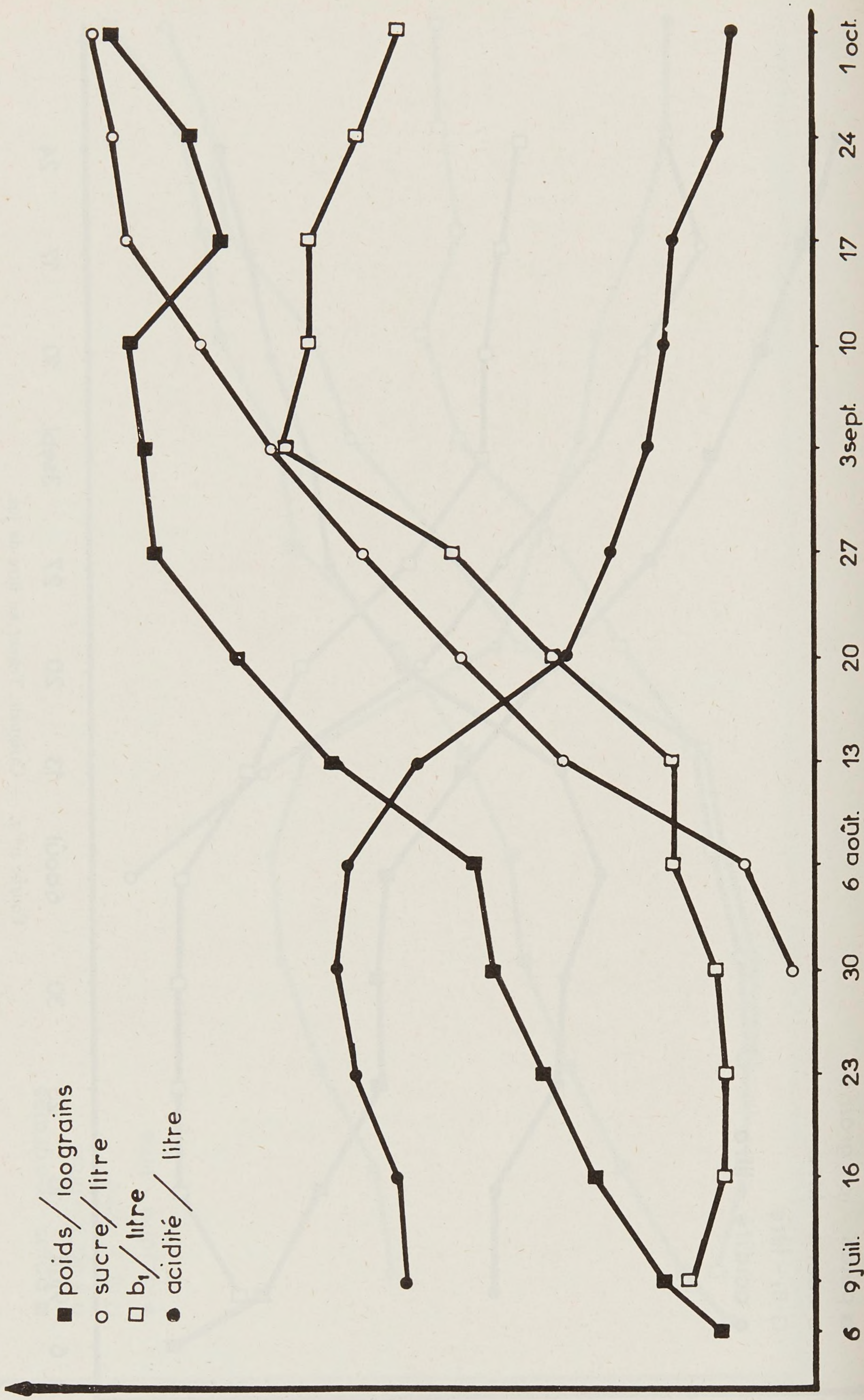
Dates des prélèvements	6/7/56		9/7/56	16/7/56	23/7/56	30/7/56	6/8/56	13/8/56		20/8/56	27/8/56	3/9/56	10/9/56	17/9/56	24/9/56	1/10/56
	Petits grains	Gros grains														
Aramon :																
Poids de 100 grains en g ...	22	65	75	112	155	186	193	224		271	341	350	387	400	415	464
Sucre g/l ...					10	10	19	23		74	95	120	131	154	158	170
B_1 γ/l ...			42	35	35	37	42	52		93	126	182	200	180	190	193
Acidité meq/l ...			370	388	440	472	578	446		266	230	188	172	130	104	104
Carignan :																
Poids de 100 grains ...	16	40	62	82	105,5	105,5	108	136		170	206	230	248	264	277	
Sucre g/l ...							10	44		90	120	139	154	170	161	
B_1 γ/l ...			80	47	47	47	47	88		115	175	218	221	230	241	
Acidité meq/l ...			366	366	426	432	470	434		288	220	192	166	146	120	
								Grains verts	Grains vérés							
Alicante :																
Poids de 100 grains ...	11,8	38,8	42	61	75	89,5	94,5	115	160	160	183	187	190	164	173	196
Sucre g/l ...						5	19	32	120	98	126	150	170	191	194	199
B_1 γ/l ...			68	50	50	54	78	60	75	145	212	300	280	290		220
Acidité meq/l ...			378	386	426	442	434	400	250	230	188	154	138	132	86	74



Courbe nº 1. — Aramon. Teneur **au** litre de jus.



Courbe nº 2. — Carignan. Teneur au litre de jus.

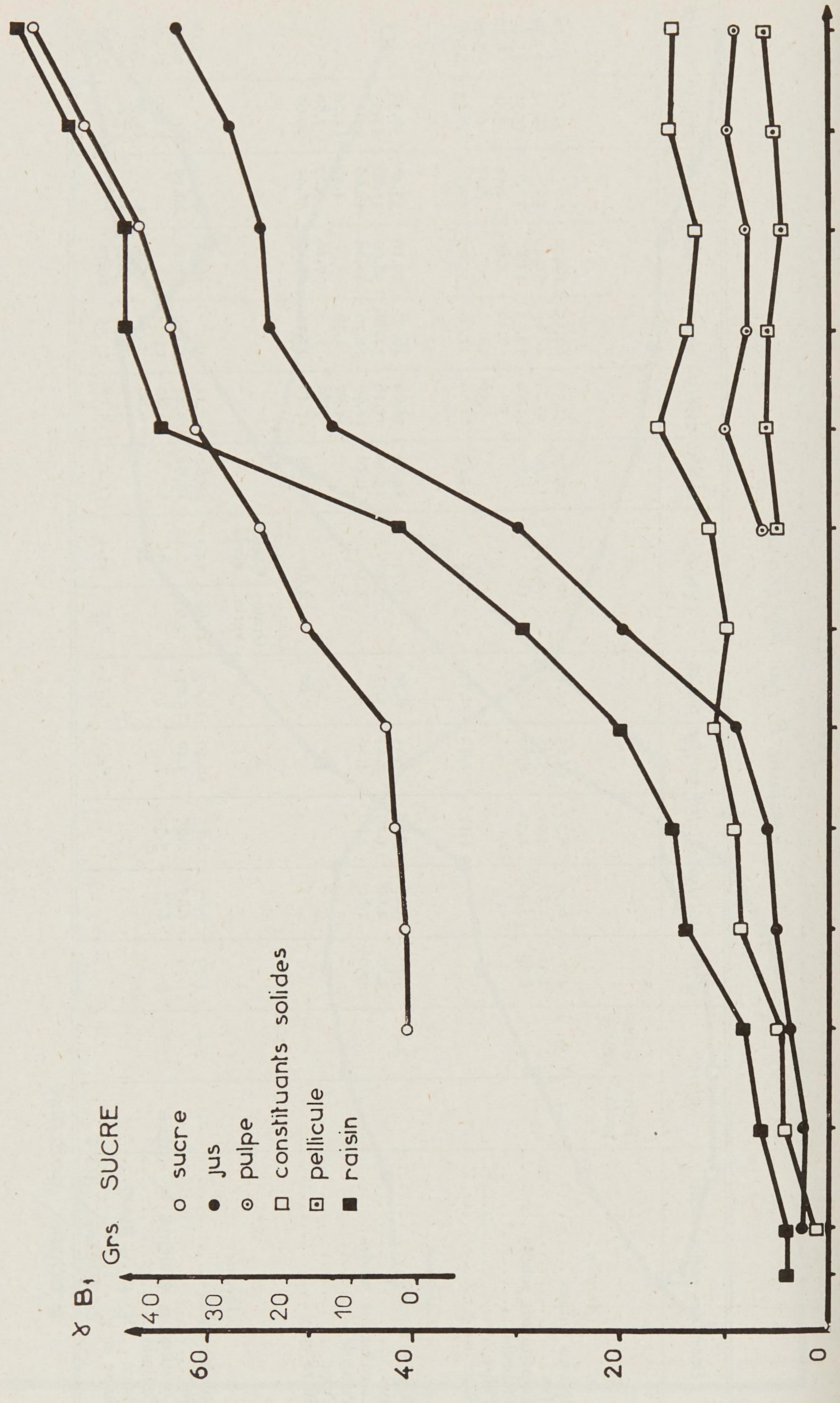


Courbe n° 3. — Alicante. Teneur au litre de jus.

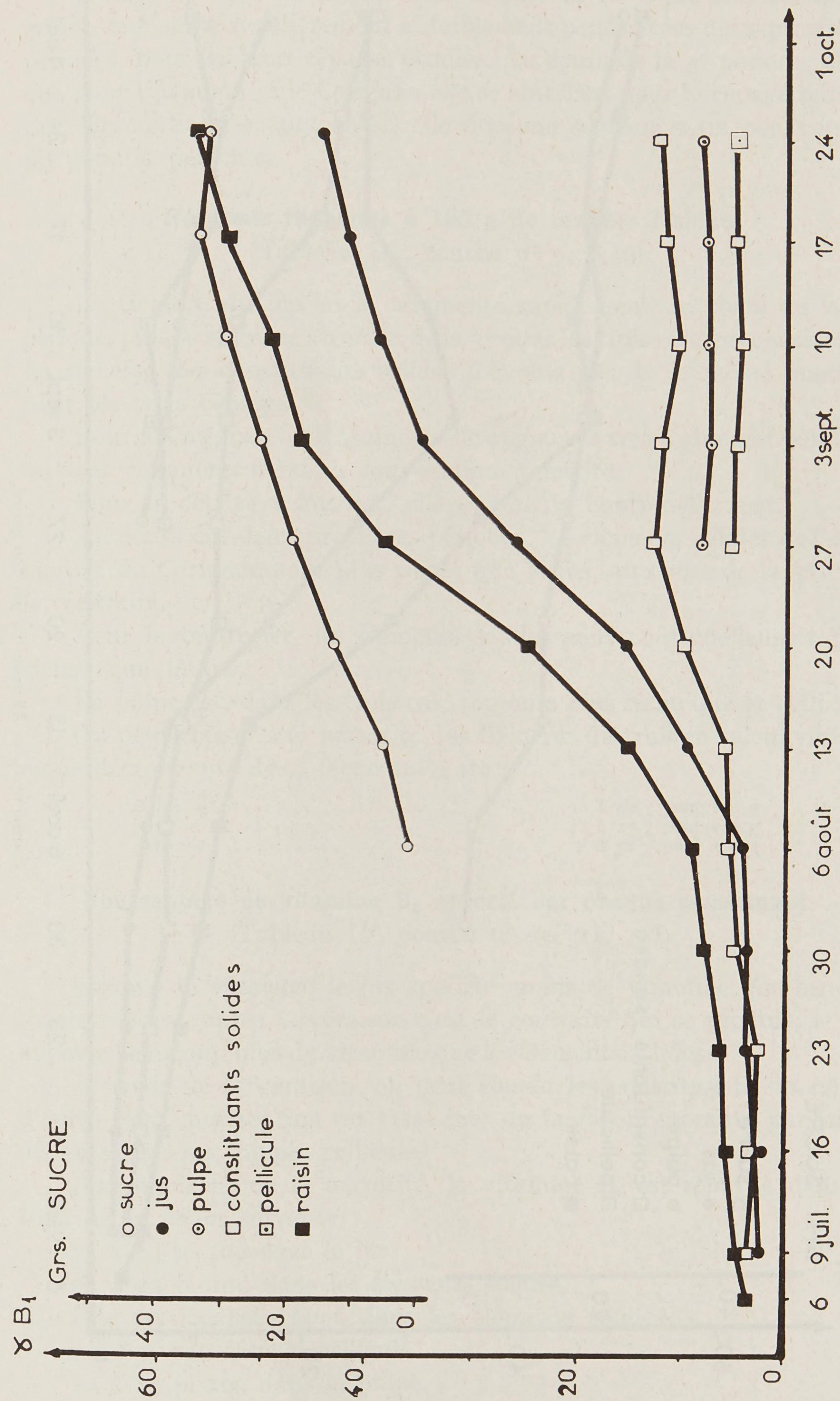
TABLEAU II

γ Vitamine B_1 par 100 grains

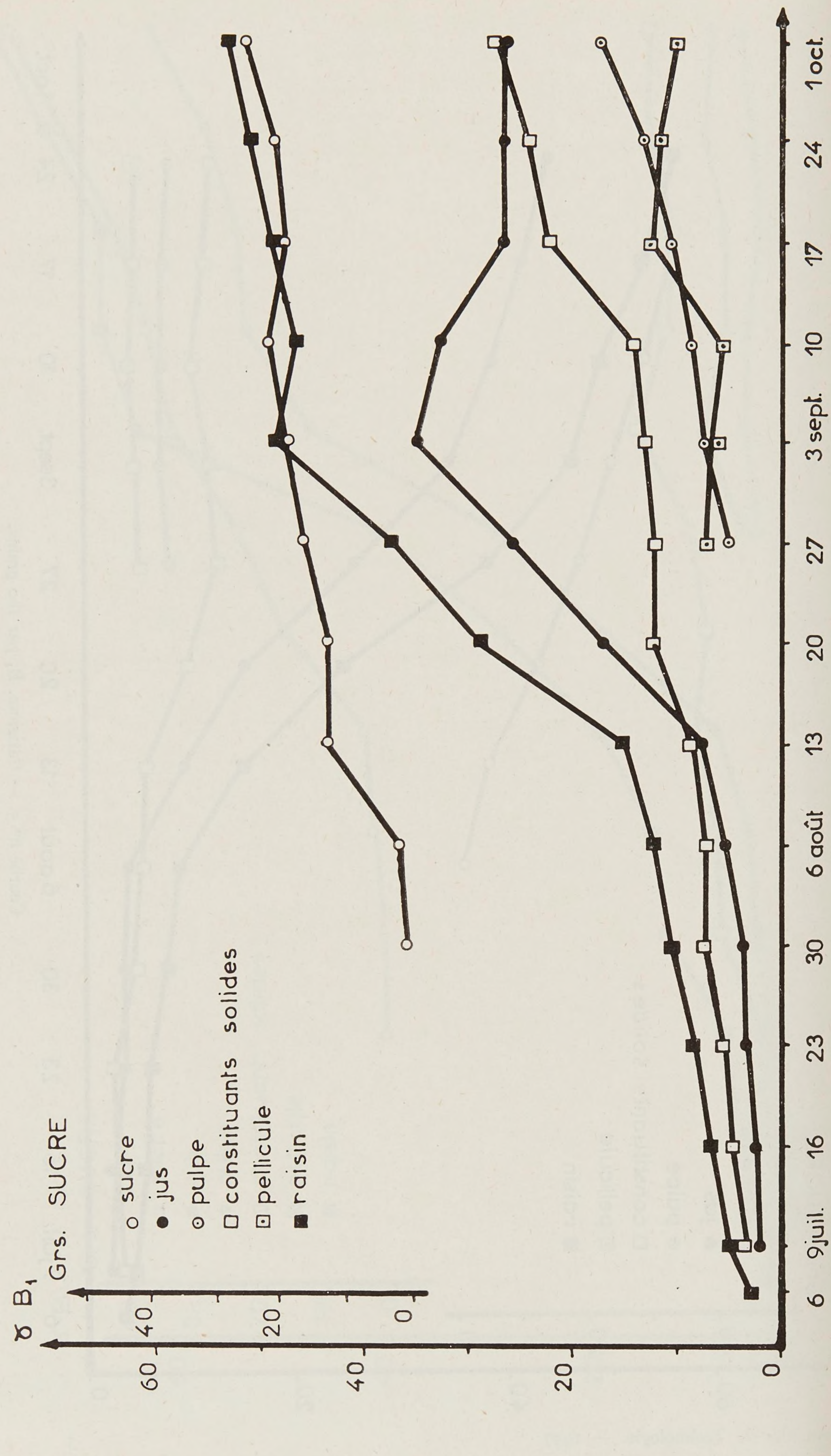
Dates des prélèvements	6/7/56		9/7/56	16/7/56	23/7/56	30/7/56	6/8/56	13/8/56		20/8/56	27/8/56	3/9/56	10/9/56	17/9/56	24/9/56	1/10/56
	Petits grains	Gros grains														
Aramon :																
Raisins entiers	3,2	5,1	4	6,70	8,30	13,85	15,10	20		29,70	41,50	64,55	68,20	68	73,64	78,70
Jus			2,31	2,42	4,02	5,25	6,132	8,94		19,90	30	48,05	54,40	55	58,14	63,30
Constituants solides			1,70	4,30	4,30	8,60	9,00	11		9,80	11,50	16,50	13,80	12,8	15,50	15,40
Pellicule											5	6,30	5,80	4,70	5,50	6,30
Pulpe											6,50	10	8	8,10	10	9,40
Sucre en g					1,17	1,42	2,77	3,95		15,83	22,60	31,68	35,60	40,35	48,35	55,76
Carignan :																
Raisins entiers		3,1	5,70	5,28	5,89	7,63	8,70	14,74		24,56	38,60	46,58	49,10	53,46	56,35	
Jus			3,20	2,68	3,29	3,43	3,71	9,24		15,06	25,46	34,88	38,90	41,86	44,35	
Constituants solides			2,50	2,60	2,60	4,20	5	5,50		9,50	12,60	11,70	10,20	11,60	12	
Pellicule											4,80	4,70	3	4,40	4,20	
Pulpe											7,80	7	7,20	7,20	7,80	
Sucre en g							0,80	4,62		11,80	17,46	22,24	27,10	30,95	29,62	
								Grains verts	Grains vérés							
Alicante :																
Raisins entiers	2,1	3,4	4,70	6,65	8,15	10,40	12,07	11,68	15,12	28,82	37,24	48	46,48	48,39		53,10
Jus			1,70	1,95	2,85	3,40	5,07	4,68	7,12	16,82	25,44	35,10	32,48	26,39		26,40
Constituants solides			3	4,70	5,30	7	7	7	8	12	11,80	13	14	22	24,30	26,70
Pellicule											6,80	6,30	5,60	12	11,50	9,70
Pulpe											5	6,70	8,40	10	12,80	17
Sucre en g						0,32	1,23	2,5	11,4	11,4	15,12	17,55	19,72	17,38	19	23,90



Courbe n° 4. — Aramon. B_1 par 100 grains.



Courbe nº 5. — Carignan. B_1 par 100 grains.



Courbe nº 6. — Alicante. B_1 par 100 grains.

Dans les parties solides du fruit, la dose de vitamine ramenée à 100 grains, augmente régulièrement et faiblement pendant les deux premières périodes, pour les trois cépages étudiés. Au cours de la 3e période, alors que pour l'Aramon et le Carignan elle se stabilise, pour le cépage teinturier elle continue à augmenter, elle diminue seulement un peu vers la fin pour la pellicule.

Résultats rapportés à 100 g de matière fraîche.
(Tableau III, courbe nº 7, 8, 9).

La richesse du jus en B_1 augmente rapidement au cours de la 2e période, puis se stabilise au cours de la 3e pour les trois cépages considérés. La richesse des constituants solides n'évolue pas de la même manière pour les trois cépages.

Pour le Carignan, et l'Aramon, elle augmente très fortement pendant les deux premières périodes pour diminuer ensuite.

Pour le cépage teinturier, elle augmente continuellement.

Au cours des deux premières périodes, les éléments solides de l'Aramon et du Carignan sont plus riches que le jus, au cours de la 3e c'est le contraire.

Pour le teinturier, les éléments solides sont continuellement plus riches que le jus.

La pulpe est, dans les trois cas, toujours plus riche que la pellicule.

On peut classer à la maturité, les éléments du fruit en valeur vitaminique décroissante de la façon suivante :

pulpe....	30 à 50 γ pour 100 g
jus..	18 à 27 γ pour 100 g
pellicule.	8 à 30 γ pour 100 g

Pourcentage de vitamine B_1 apporté par chaque constituant.
(Tableau IV, courbe nº 10, 11, 12).

Jusqu'à la véraison, le jus apporte moins de vitamine que les éléments solides ; après la véraison c'est le contraire qui se produit, le jus apporte beaucoup plus de vitamine que les éléments solides.

A partir de la véraison, on peut classer les constituants du raisin d'après leur contribution en vitamine, de la façon suivante par ordre décroissant : jus, pulpe, pellicule.

Aux environs de la maturité, la vitamine B_1 est répartie dans le fruit de la façon suivante :

75 à 80 p. 100 dans le jus.

20 à 25 p. 100 dans les éléments solides.

Elle est localisée ainsi dans les éléments solides ;

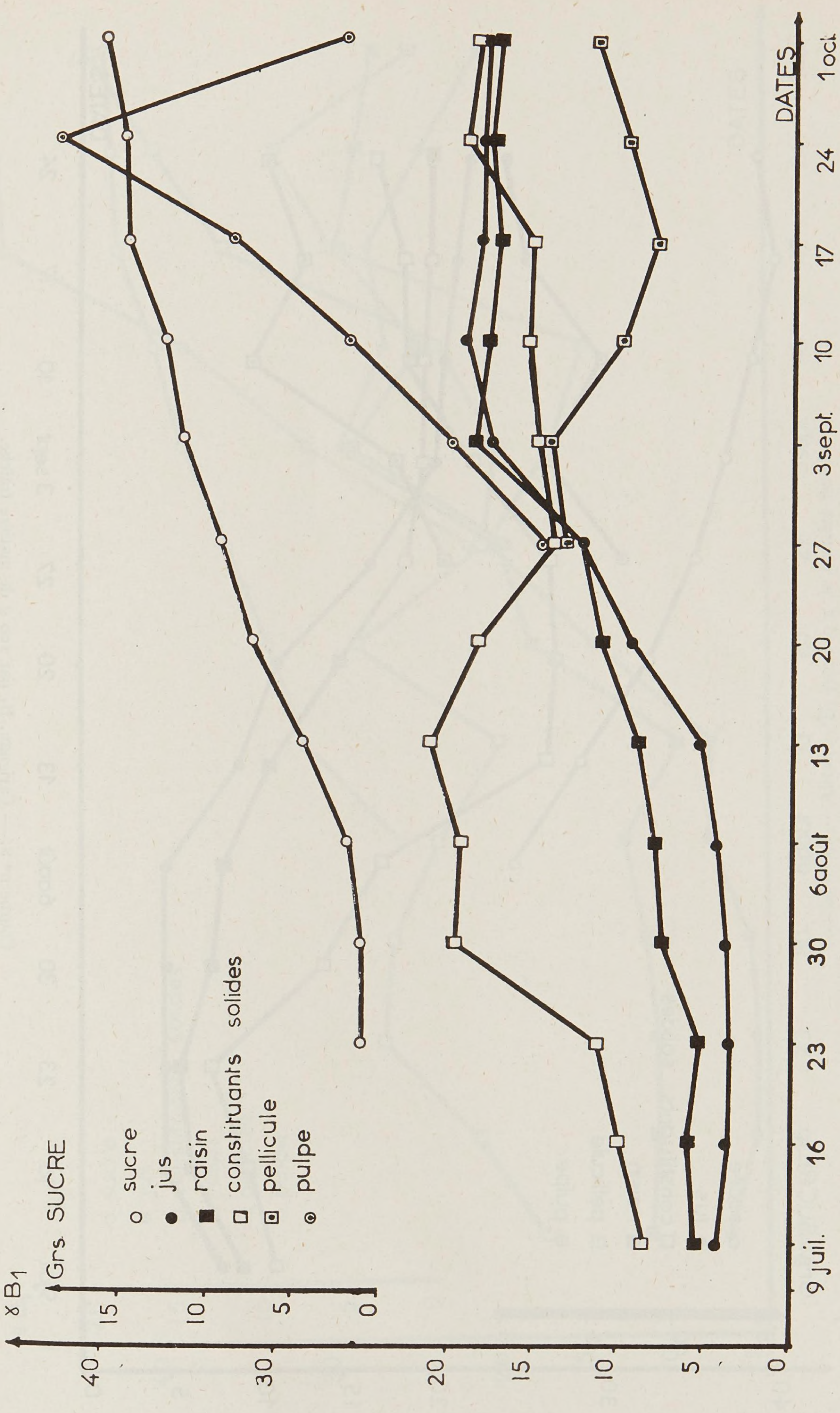
7 à 8 p. 100 dans la pellicule.

12 à 15 p. 100 dans la pulpe.

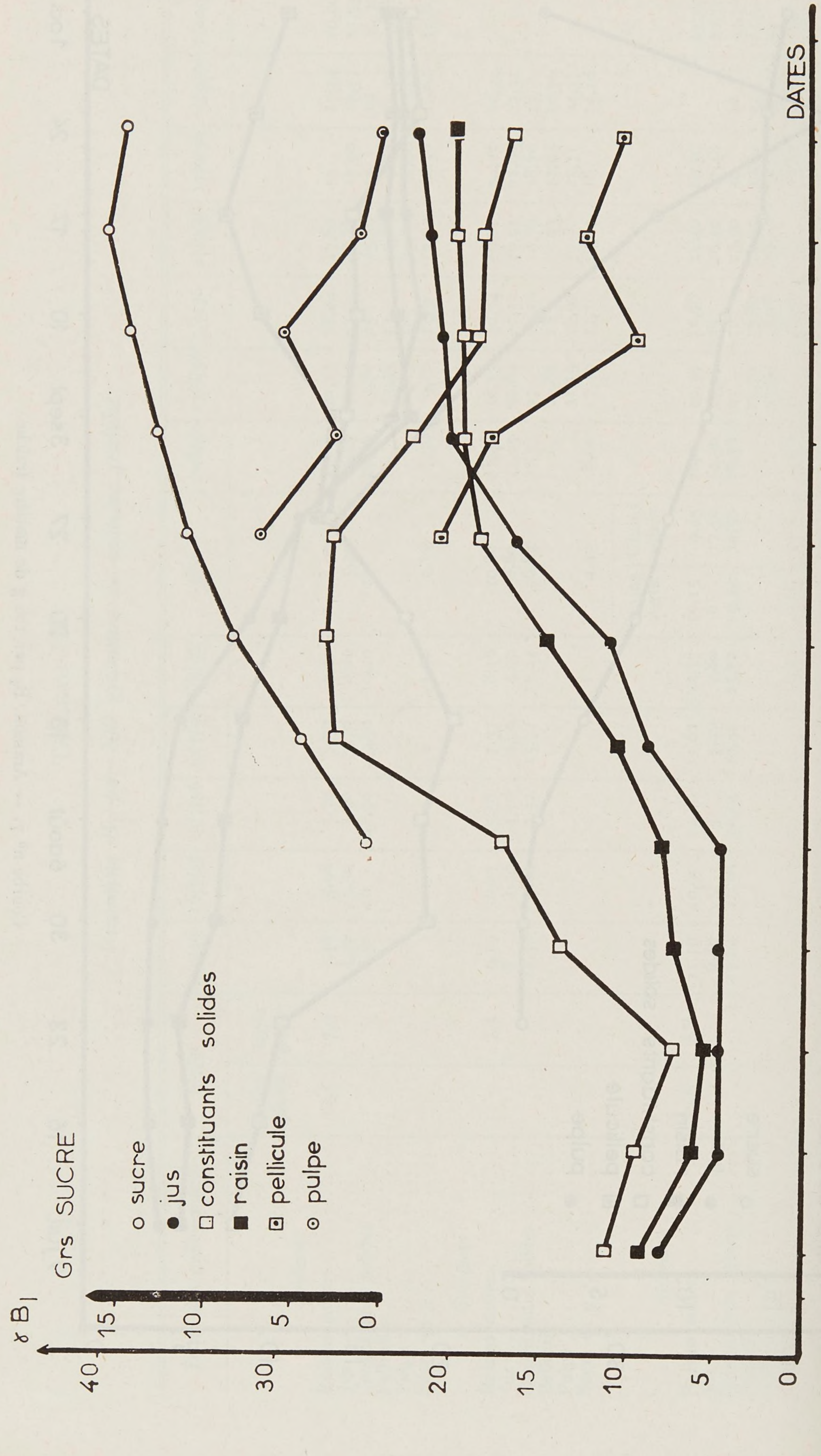
TABLEAU III

γ *Vitamine B_1 par 100 grammes de matière fraîche*

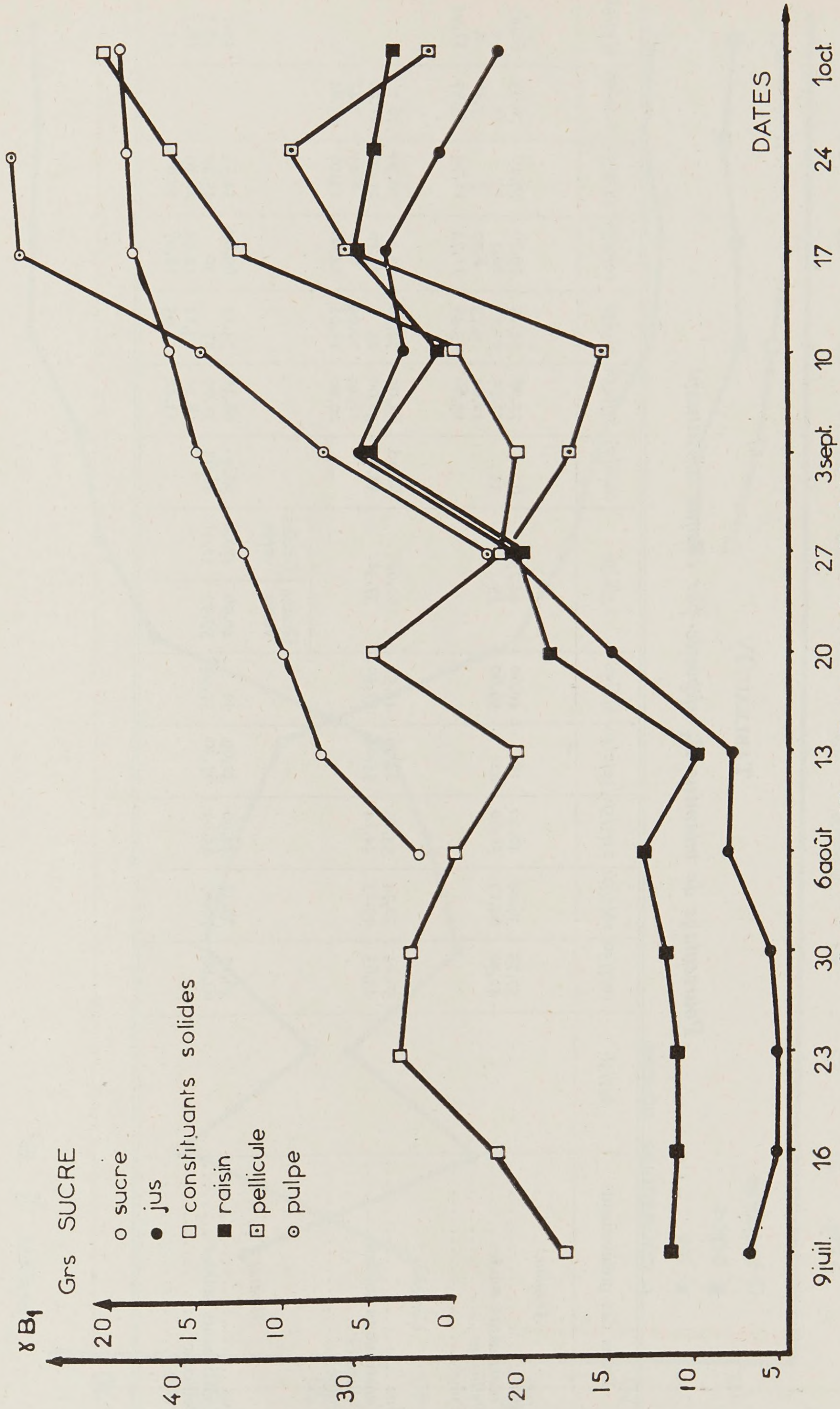
Dates des prélèvements	6/7/56		9/7/56	16/7/56	23/7/56	30/7/56	6/8/56	13/8/56		20/8/56	27/8/56	3/9/56	10/9/56	17/9/56	24/9/56	1/10/56
	Petits grains	Gros grains														
Aramon :																
Raisins entiers	14,5	7,9	5,46	5,98	5,30	7,50	7,90	8,90		11	12,17	18,44	17,62	17	17,74	16,96
Jus			4,20	3,50	3,50	3,70	4,20	5,20		9,17	12,07	17,22	18,88	17,90	17,77	17,93
Constituants solides			8,50	10	11,30	19,50	19,20	21		18,20	13,70	25	15,30	15	19	16,30
Pellicule											13,33	14	9,83	7,83	9,56	11,48
Pulpe											14,13	50	25,80	32,40	42,55	26
Sucre en g					1	1	1,90	2,30		7,30	9,10	11,30	12,30	14,50	14,70	15,80
Carignan :																
Raisins entiers		7,8	9,19	6,27	5,58	7,37	8,10	10,80		14,40	18,73	20,34	19,80	20,25	20,34	
Jus			8	4,70	4,70	4,70	4,70	8,80		11,07	16,64	20,51	20,91	21,63	22,51	
Constituants solides			11,36	9,62	7,32	13,77	17,24	26,82		27,53	27	22,50	18,70	18,70	17	
Pellicule											20,86	18	9,83	12,94	10,76	
Pulpe											31,19	26,92	30	25,71	24,37	
Sucre en g							1	4,40		8,60	11,40	13,10	14,60	16	15,10	
								Grains verts	Grains vérés							
Alicante :																
Raisins entiers	17,8	8,8	11,19	10,90	10,86	11,62	12,77	10,15	9,45	18,01	20,34	25,66	24,46	29,50		27,50
Jus			6,80	5	5	5,40	7,80	6	7,50	14,50	20,27	29	26,40	27,48		20,78
Constituants solides			17,64	21,36	29,44	26,42	23,72	19,44	12,50	28,50	23	22	23,50	36	40	43,70
Pellicule											22,70	16,80	14,90	29,60	33	24,90
Pulpe											23,70	31,16	38,20	48,80	49,2	75
Sucre en g							1,90	3,20	12	9,60	12	14,50	16	18,10	18,30	18,80



Courbe nº 7. — Aramon. B_1 par 100 g de matière fraîche.



Courbe n° 8. — Carignan. B_1 par 100 g de matière fraîche.

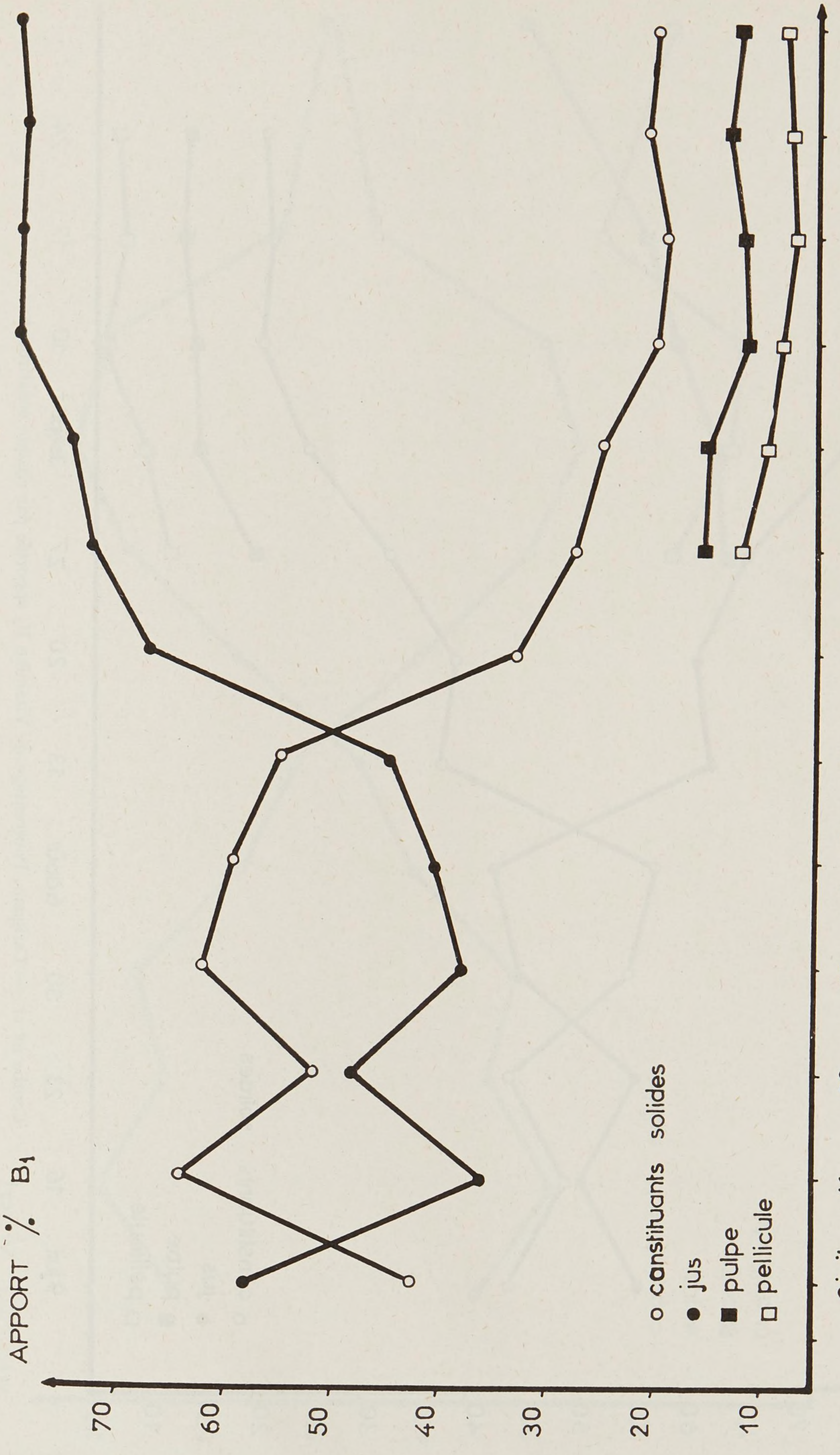


Courbe n° 9. — Alicante. B_1 par 100 g de matière fraîche.

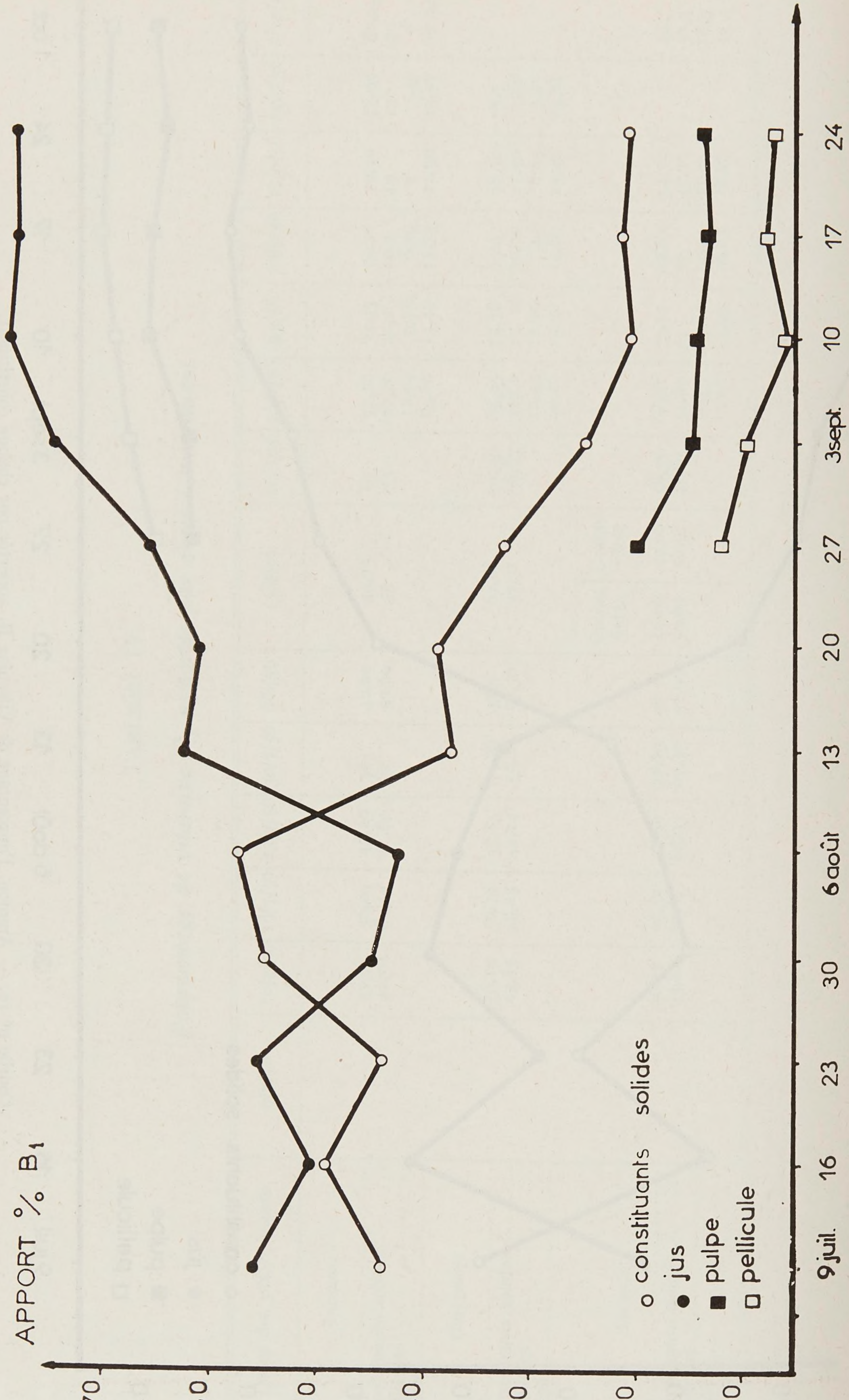
TABLEAU IV

Pourcentage de vitamine B_1 apportée par chaque constituant

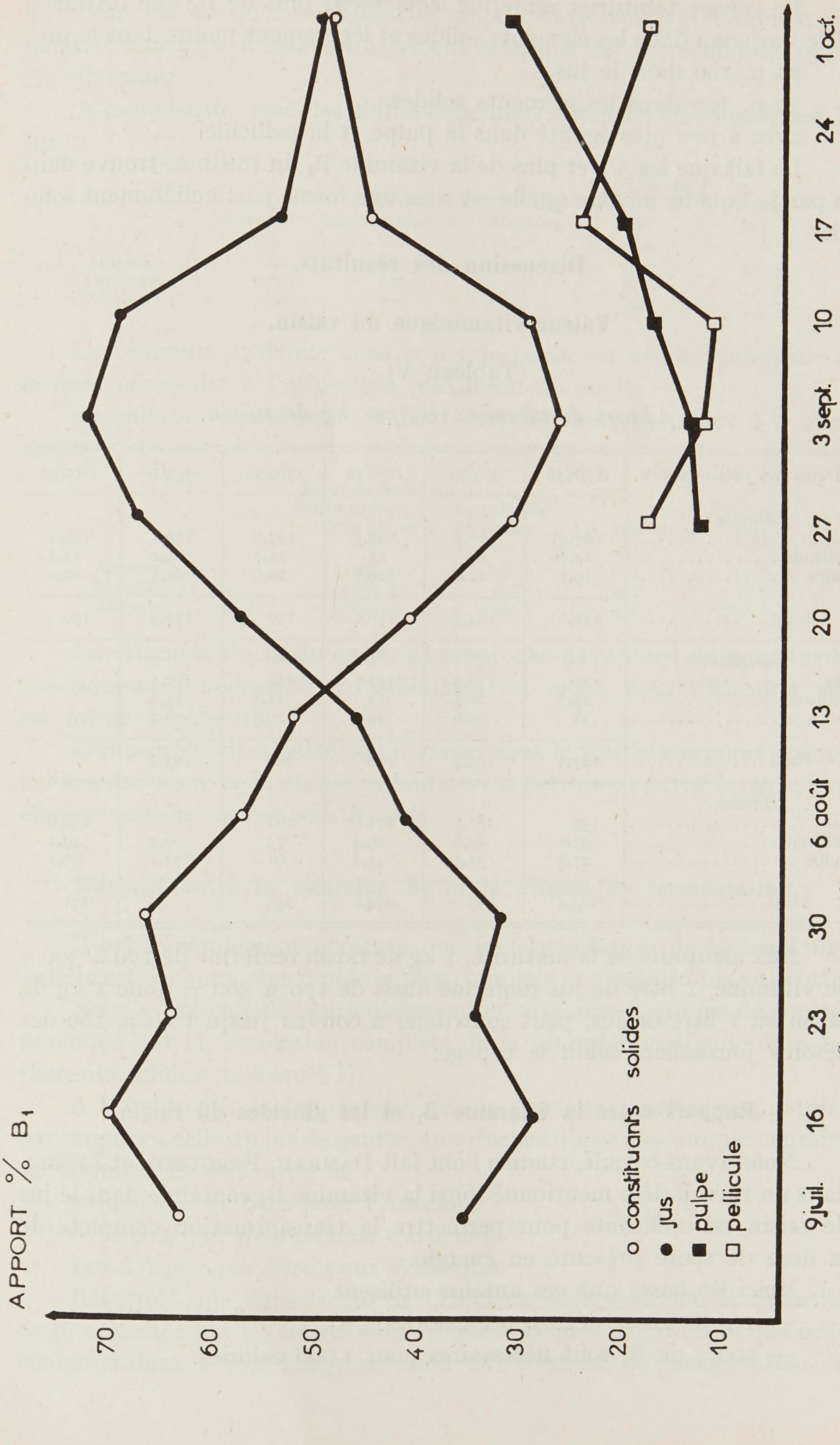
Dates des prélèvements	6/7/56	10/7/56	16/7/56	23/7/56	30/7/56	6/8/56	13/8/56		20/8/56	27/8/56	3/9/56	10/9/56	17/9/56	24/9/56	1/10/56
Aramon :															
Jus		57,75	36,04	48,20	38	40,60	44,75		67	72,28	74,43	79,76	79,40	78,95	80,43
Constituants solides		42,50	64,17	51,80	62	59,60	55		33	27,70	25,2	20,2	19	21	20
Pellicules										12,04	9,75	8,50	7	7,46	8
Pulpe										15,66	15,49	11,73	11,90	13,57	11,94
Carignan :															
Jus		56,14	50,74	55,85	44,96	42,5	62,68		61,30	65,95	74,78	79,22	78,30	78,7	
Constituants solides		43,85	49,25	44,14	55,04	57,50	37,31		38,67	32,60	25	20,70	21,70	21,20	
Pellicules										12,43	10,09	6,11	8,23	7,45	
Pulpe										20,20	15,02	14,66	13,46	13,84	
							Grains verts	Grains vérés							
Alicante :															
Jus		36,17	29,32	34,96	32,69	42	40,06	47,08	58,36	68,31	73,12	69,87	54,53		49,7
Constituants solides		63,82	70,67	65,03	67,30	57,99	59,93	52,91	41,63	31,60	27	30	45,30		50,3
Pellicules										18,25	13,12	12,04	21,79		18,3
Pulpe										13,42	13,95	18,07	20,66		32



Courbe nº 10. — Aramon. Pourcentage de Vitamine B_1 apportée par chaque constituant.



Courbe nº 11. — Carignan. Pourcentage de Vitamine B_1 apportée par chaque constituant.



Courbe n° 12. — Alicante. Pourcentage de Vitamine B_1 apportée par chaque constituant.

Le cépage teinturier renferme légèrement plus de B_1 que l'Aramon et le Carignan dans les éléments solides et légèrement moins dans le jus :

70 p. 100 dans le jus.

30 p. 100 dans les éléments solides.

avec à peu près égalité dans la pulpe et la pellicule.

Le fait que les 3/4 et plus de la vitamine B_1 du raisin se trouve dans la partie liquide, montre quelle est sous une forme particulièrement soluble.

Discussion des résultats.

Valeur vitaminique du raisin.

(Tableau V).

Apport de vitamine B_1 par kg de raisin.

Dates des prélèvements	27/8/56	3/9/56	10/9/56	17/9/56	24/9/56	1/10/56
Aramon :						
Jus	87,97	137,5	140,5	137,7	140,1	136,4
Pellicule	14,66	18	15	11,7	13,2	13,4
Pulpe	19,1	28,8	20,7	20,6	24,1	20,2
Total	121,6	184,3	176,2	170	177,4	170
Carignan :						
Jus	124	152,3	157	159	160,1	
Pellicule	25,3	20,5	12	11,5	15,2	
Pulpe	38	30,6	29	29,5	28,1	
Total	187,3	203,4	198	200	203,4	
Alicante :						
Jus	139	187,6	171	161		134,6
Pellicule	37,1	33,6	29,4	73	66,4	49,4
Pulpe	27,3	35,8	44,2	61	74	86,7
Total	203,4	257	244,6	295		271

Aux alentours de la maturité, 1 kg de raisin renferme de 170 à 300 γ de vitamine, 1 litre de jus renferme aussi de 170 à 300 γ, donc 1 kg de raisin ou 1 litre de jus, peut contribuer à couvrir jusqu'à 40 p. 100 des besoins journaliers selon le cépage.

Rapport entre la vitamine B_1 et les glucides du raisin.

Nous avons calculé, comme l'ont fait Damrau, Ferguson et Lesser dans un travail déjà mentionné (6) si la vitamine B_1 contenue dans le jus de raisin est suffisante pour permettre la transformation complète de la dose de sucre présente en énergie.

Voici les bases que ces auteurs utilisent :

— 1 g de sucre dégage 4,1 calories.

— 500 γ de B_1 sont nécessaires pour 1 000 calories.

Dans les jus qu'ils utilisent, le rapport entre sucre et vitamine est parfait : leur prise d'essai d'une valeur calorique de 300, renferme 150 γ de vitamine.

A la maturité, voici les chiffres que nous obtenons en considérant le jus :

	Sucre/litre	Calories correspondantes	γB_1 calculée nécessaire	γB_1 trouvée par 1 l. de jus	Pourcentage
	—	—	—	—	—
Aramon .	160	656	328	190	58 %
Carignan.	160	656	328	240	73 %
Alicante.	190	779	389	300	77 %

La vitamine contenue dans le jus de raisin est un peu inférieure à la dose nécessaire à l'utilisation maximum du sucre.

Considérons maintenant le fruit complet, correspondant à 1 litre de jus :

	Poids de fruit correspondant à 1 litre de jus	γB_1 calculée nécessaire	γB_1 trouvée	Pourcentage
	—	—	—	—
Aramon	1356 g	328	241	73 %
Carignan.........	1505 g	328	305	93 %
Alicante	1640 g	389	475	122 %

La vitamine du raisin entier se rapproche davantage de la quantité théoriquement nécessaire à l'utilisation du sucre, pour l'Alicante elle est même supérieure.

Ceci semblerait montrer qu'il existe dans le fruit un rapport convenable entre sucre et B_1 et que ce rapport est détruit en partie lorsque l'on élimine certains de ces constituants.

Rapport entre la vitamine B_1 et la vitesse de fermentation.

Il est généralement constaté que la fermentation de la vendange entière est toujours plus rapide et plus complète que celle du jus de goutte.

Nous avons calculé l'enrichissement en vitamine B_1 du jus de goutte, provoqué par la dissolution complète de la vitamine contenue dans les éléments solides (tableau VI).

A la maturité, la fermentation de la vendange entière se produira par rapport à celle du jus de goutte, en présence d'une dose supplémentaire de vitamine B_1 de l'ordre de :

50 à 60 γ par litre pour l'Aramon.

60 à 80 γ par litre pour le Carignan.

120 à 140 γ par litre pour l'Alicante.

Il semble que dans le cas de l'Alicante seulement, où la quantité de B_1 apportée par les constituants solides est aussi importante que celle contenue dans le jus, l'augmentation de la vitesse de fermentation en

présence de la vendange entière puisse être attribuée en partie à l'augmentation de la dose de vitamine B_1.

Pour conclure, il faudrait connaître exactement entre quelles limites la vitesse de fermentation est proportionnelle à la dose de thiamine.

TABLEAU VI

Apport de vitamine B_1 au litre de jus.

Dates des prélèvements	27/8/56	3/9/56	10/9/56	17/9/56	24/9/56	1/10/56
Aramon :						
Jus	126	182	200	180	190	193
Pellicule	21	23,8	21,3	16	18	19,2
Pulpe	27,2	37,8	29,5	28	32	26,8
Total	174	243,6	250,8	224	240	239
Augmentation	48	61,6	50,8	44	50	46
Carignan :						
Jus	175	218	221	230	241	
Pellicule	33	29,4	17	24,2	22,8	
Pulpe	53,8	43,8	41	39,6	42,4	
Total	241,8	291,2	279	293,8	306,2	
Augmentation	86,8	73,2	58	63,8	65,2	
Alicante :						
Jus	212	300	280	290	260	220
Pellicule	56,7	54	48,3	132	117,3	81
Pulpe	41,6	57,4	72	110	130	141
Total	310,3	411,4	400,3	532	507,3	442
Augmentation	98,3	111,4	120,3	242	247,3	222

Le problème de l'influence de la vitamine B_1 ajoutée au jus de raisin sur sa vitesse de fermentation est assez contreversé :

Pour certains auteurs, il n'y a jamais assez de vitamine B_1 dans le moût de raisin pour donner à la fermentation sa vitesse maximum (29).

Pour d'autres, le jus de raisin est naturellement assez riche en cette vitamine (30) (31).

Enfin, pour d'autres encore, la B_1 possède une action activatrice pour certaines doses et une action retardatrice pour des doses supérieures (32) (33).

CONCLUSION

Au cours de cette étude :

Nous avons adapté et comparé entre elles deux méthodes de dosage de la thiamine dans le raisin et son jus, une biologique et une chimique. La première semble doser des corps qui ne seraient pas la vitamine entière, nous avons choisi la seconde qui nous a paru plus spécifique et rapide.

Nous avons constaté que :

Au cours de la maturation la vitamine B_1 du raisin augmente conti-

nuellement, mais avec une vitesse variable, c'est au moment de la véraison que cette vitesse est la plus grande.

Le jus s'enrichit beaucoup plus que les constituants solides, cela tendrait à montrer que la vitamine B_1 évoluerait dans le raisin vers une forme soluble.

A la maturité 75 à 80 p. 100 de la thiamine totale du fruit se trouve dans le jus.

Des deux constituants solides du fruit, la pulpe fournit davantage de vitamine que la pellicule.

En valeur intrinsèque, c'est la pulpe qui est la plus riche puis vient le jus et ensuite, la pellicule.

La valeur vitaminique B_1 du raisin et du jus de raisin n'est pas négligeable puisque 1 kg de fruit ou 1 litre de jus peuvent fournir 40 p. 100 de la ration journalière de l'homme.

La vitamine B_1 est dans les cas considérés légèrement inférieure à la dose nécessaire à l'utilisation du sucre présent.

Reçu pour publication le 26 février 1957.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) RANDOIN (Mme L.). — Recherches sur la valeur alimentaire des jus de raisins frais et des vins, au point de vue de leur teneur en vitamines. *Bull. de la Soc. d'Hygiène Alimentaire*, **16**, p. 464-486, 1928.

(2) RANDOIN (Mme L.). — Étude comparative, au point de vue des vitamines hydrosolubles de la valeur nutritive du raisin blanc et du raisin noir. *Bull. int. du vin*, **12**, p. 69 à 72, 1939 (Résumé).

(3) MORGAN (A. F.) NOBLES (H. L.), WIENS (A.), MARSH (G. L.) et WINKLER (A. J.). — The B vitamins of California grape juices and wines. *Food Res*, **4**, 217-229, 1939.

(4) GENEVOIS (L.), FLAVIER (H.). — Dosage des vitamines B_1 et B_2 dans les tissus végétaux. *C. R., Soc. Biologie*, **130**, p. 497, 1939.

(5) Note de FLAVIER (H.) présentée par GENEVOIS (L.). — Évolution des vitamines B_1 et B_2 au cours de la maturation du raisin et de la fermentation alcoolique. *C. R. Soc. Biologie*, **130**, p. 499, 1939.

(6) DAMRAU (F.), FERGUSON (E. A.) et LESSER (J. R. et M. A.). — Quick energy value of hexose (dextrose-levulose) in grape juice. *Med. Record*, **156**, p. 612-614 et 619, 1943.

(7) LAVOLLAY (J.) et PATRON (A.). — Les jus de fruits. — Conservation et propriétés. — *Ann. de la Nutrition*, p. 529-569, 1947.

(8) LAVOLLAY (J.) et PATRON (A.). — Les jus de fruits. — Composition et fabrication. *Ann. de la Nutrition*, p. 315 à 337, 1947.

(9) SCHANDERL (H.). — Die mikrobiologie des weines. — 1950, Eugen Ulmer Stuttgart-z Z Ludwigsburg p. 47, 49.

(10) SISSAKIAN (N.), EGOROV (I.), SAAKIAN (P.). — Sur l'intensité des réactions biochimiques au cours de la jérézation des vins. *Biochimiya Vinodeliya*, S. S. S. R., nº 3, p. 57, 1950.

(11) BOUKINE d'après FROLOV-BAGREEV (A.) et AGABALIANTZ (G.). — *Chimie du vin*, 1951, 93, Moscou.

(12) NEGROUL (A.). — *Viticulture*, 1952, p. 5, Moscou.

(13) HALL (A. P.), BRINNER (L.), AMERINE (M. A.) et MORGAN (A. F.). —

The B vitamin content of grapes musts, and wines. *Food Research*, **21**, p. 362-371, 1956.

(14) JACQUOT (R.), ARMAND (M[lle] Y.) et REY (P.). — Méthodes de dosage de la vitamine B_1. *Bull. de la Société d'Hygiène Alim.*, **28**, p. 1 à 71, 1941.

(15) SCHULTZ (A. S.) ATKIN (L.) et FREY (C. N.). — A fermentation test for vitamin B_1 (1). *J. Am. Chem. Soc.*, **59**, p. 948-949, 1937.

(16) SCHULTZ (A. S.), ATKIN (L.) et FREY (C. N.). — Influence of nicotinic acid on the fermentation method for vitamin B_1 determination. *J. Americ. Chem. Soc.*, **60**, p. 1 414-1 415, 1938.

(17) SCHULTZ (A. S.), ATKIN (L.) et FREY (C. N.). — Ultramicro-détermination of thiamine by the fermentation méthod. *J. Biol. Chem.*, **129**, p. 471-476, 1939.

(18) SCHULTZ (A. S.), ATKIN (L.) et FREY (C. N.). — A fermentation test for vitamin B_1 (II). *J. Am. Chem. Soc.*, **59**, p. 2457-2460, 1937.

(19) SCHULTZ (A. S.), ATKIN (L.) et FREY (C. N.). — The specificity of the fermentation test for vitamin B_1. *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, p. 3084-3085, 1938.

(20) SCHULTZ (A. S.), ATKIN (L.) et FREY (C. N.). — A method for the determination of thiamine and certains of its metabolic products in urine. *J. Biol. Chem.*, **136**, 713-717, 1940.

(21) WILLIAMS (R. R.) and SPIES. — Vitamin B_1 and its use in medicine. Macmillan, New-York N. Y., 1938, p. 146.

(22) SCHULTZ (A. S.) ATKIN (L.), FREY (C. N.) et WILLIAMS (R. R.). — Application of the sulfite cleavage of thaimin to the yeast fermentation method. *J. Am. Chem. Soc.*, **63**. p. 632-633, 1941.

(23) SCHULTZ (A. S.), ATKIN (L.) et FREY (C. N.). — Determination of vitamin B_1, by yeast fermentation method. — Improvements related to use of sulfite cleavage and a new fermentometer. *Ind. Eng. chem. Anal. Ed.*, **14**, p. 35 à 39, 1942.

(24) ARMAND (M[lle] Y.). — Application de la micromanométrie au dosage de l'aneurine. *Ann. des Fermentations.*, **7**, p. 40 à 49, 1942.

(25) JANSEN (B.). — *Rec. Travaux. Chim.*, Pays-Bas, **55**, p. 1046-52, 1936. D'après JACQUOT, ARMAND et REY (14)

(26) CONNER (R. T.) et STRAUB (G. J.). — Determination of thiamine by the thiochrome reaction. *Ind. Eng. Chem.*, **12**, p. 380 à 384, 1941.

(27) Methods of vitamin assay.— Prepared and edited by The Asssociation of vitamin chemists, Inc-Interscience publishers.

(28) PETIT (L.). — Contribution à l'étude du dosage et de la répartition de l'aneurine dans le blé, la farine et le pain. *Ann. Agronomiques*, **1**, p. 41 à 107, 1950.

(29) DUPUY (P.) et FLANZY (M.). — Influence de la thiamine sur la fermentation du jus de raisin. *Acad. d'Agr. de Fr.*, **40**, p. 273 à 277, 1954.

(30) RIBEREAU-GAYON (J.) et PEYNAUD (E.). — Sur l'emploi en vinification de quelques activeurs vitaminiques de la fermentation. *Acad. Agr. de Fr.*, **28**, p. 444-448, 1952.

(31) PEYNAUD (E.). — Travaux d'actualité de la Station Œnologique de Bordeaux. *Rev. des Fermen. des Ind. Alim.*, **7**, p. 71 à 78, 1952.

(32) GARINO-CANINA (E.) et TREVISIOL (E.). — I fattori di accrescimiento nella tecnica enologica. Annuario della stazione enologica sperimentale di ASTI. Vol. **4**, publicazione n° 251, 1954.

(33) KNUCHEL (F.) DESHUSSES (L.) et CORBAZ (J.). — Influence de la vitamine B_1 et de quelques sels minéraux sur la fermentation alcoolique du jus de raisin et la rétrogradation malolactique. *Rév. des Ferm. et des Ind. Alim.*, **9**, p. 39-43, 1954.

OBSERVATIONS SUR LA MATURITÉ D'UN RAISIN DE TABLE

PAR

Mlle LAMAZOU-BETBEDER et Mme PECH
Station Agronomique et Œnologique, Toulouse.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.
II. — Observations sur la maturité des raisins.
III. — Généralités sur les indices de maturité.
IV. — Aperçu sur la maturation du « Chasselas Doré de Moissac »
V. — Remarques sur l'indice de maturité du Chasselas.
VI. — Conclusions.

I. — Introduction.

Le problème de la maturité doit être envisagé sous un angle différent suivant qu'il se rapporte à des raisins de table ou de cuve, du fait qu'ils n'ont pas la même destination. Pour déterminer la date des vendanges, l'intérêt est orienté vers l'obtention d'une teneur maximum en glucides. Il ne doit pas être guidé, pour la consommation, par la recherche de ce dernier stade de la maturation : un équilibre antérieur peut être envisagé, car le fruit est susceptible de posséder alors des qualités de fraîcheur aptes à le faire mieux apprécier.

C'est cette notion que ce travail va essayer de préciser en même temps qu'il se donne pour but de fixer l'époque relative à ce degré de maturité pour un cépage donné.

Il sera appliqué au « Chasselas Doré de Moissac » dans l'ensemble de ses variétés et à l'étude de l'indice de maturité de ce raisin déduit des principaux constituants de la baie ; cela pendant deux années consécutives mais dissemblables au point de vue météorologique.

II. — Observations sur la maturité des raisins.

Depuis la véraison jusqu'au moment où le fruit est cueilli, la maturation se poursuit suivant un rythme connu pour atteindre le stade dit

de la « maturité industrielle ». Cet état est représenté par un ralentissement dans la vie de la baie : la richesse saccharine du jus et sa teneur en acides ne varient sensiblement plus. Le grain renferme alors une dose maximum de sucre avec une acidité minimum, ce qui convient à un raisin devant servir à l'élaboration du vin.

Mais pour définir ce que l'on peut appeler la « maturité gustative » d'un raisin de table, un équilibre différent doit être considéré. Le fruit pourra être déclaré mûr sans avoir la composition exigée pour un raisin destiné à produire du vin, ce qui rendrait parfois la baie trop douce et trop fade. Une certaine fraîcheur liée à une combustion incomplète de l'acide malique sera susceptible d'être appréciée, ce qui permet de dire que la maturité gustative de ce raisin sera située, dans le temps, avant sa maturité industrielle.

Afin d'écarter les fruits verts du marché en début de campagne, des indices de maturité ont été établis dans le but de fixer parmi des états physicochimiques relativement voisins celui à partir duquel le raisin possède des qualités gustatives et physiologiques certaines. Ils vont être définis et examinés brièvement.

III. — Généralités sur les indices de maturité.

Plusieurs normes ont été proposées comme indices pour les raisins de cuve, par exemple le rapport $\frac{\text{glucose}}{\text{lévulose}}$ (6) ou $\frac{\text{acide tartrique} \times 100}{\text{acides organiques totaux}}$ (3). Mais il ne sera envisagé ici que celle retenue pour les raisins de table, désignée par indice de maturité, qui est égal à la valeur du rapport $\frac{\text{sucres}}{\text{acidité titrable}}$, la richesse saccharine étant exprimée en grammes de glucose par litre et la dose d'acides en grammes d'acide tartrique par litre.

Divers auteurs ont donné à ce coefficient des valeurs sensiblement différentes. La limite avait été fixée à 20 pour le Chasselas du littoral algérois (2), à 25 pour le Chasselas des régions de Montpellier (7) et d'Avignon (10). Des travaux et une réglementation récentes (1-5) donnent des chiffres inférieurs aux précédents pour l'indice de maturité d'un raisin de table n'ayant pas une appellation d'origine.

Le rapport $\frac{\text{sucres}}{\text{acidité}}$ n'est pas exempt de critiques, car pour l'établir on fait intervenir deux constituants du fruit formés grâce à des phénomènes différents : la photosynthèse et la respiration, indépendants l'un de l'autre. Toutefois, les doses respectives des deux composants du raisin servant à le calculer ont chacune, prises à part, une signification certaine (11). De plus une étude récente indique qu'on peut, dans l'état actuel de

nos connaissances, attacher à cette norme un certain intérêt en vue de la discrimination de divers types de raisins (4).

La notion de maturité d'un raisin de table définie précédemment va être appliquée au « Chasselas Doré de Moissac ». Pour cela, il est nécessaire de suivre le fruit au cours de sa maturation jusqu'à la « maturité industrielle », pour déterminer ensuite, par rapport à celle-ci, le stade de la « maturité gustative » de ce cépage.

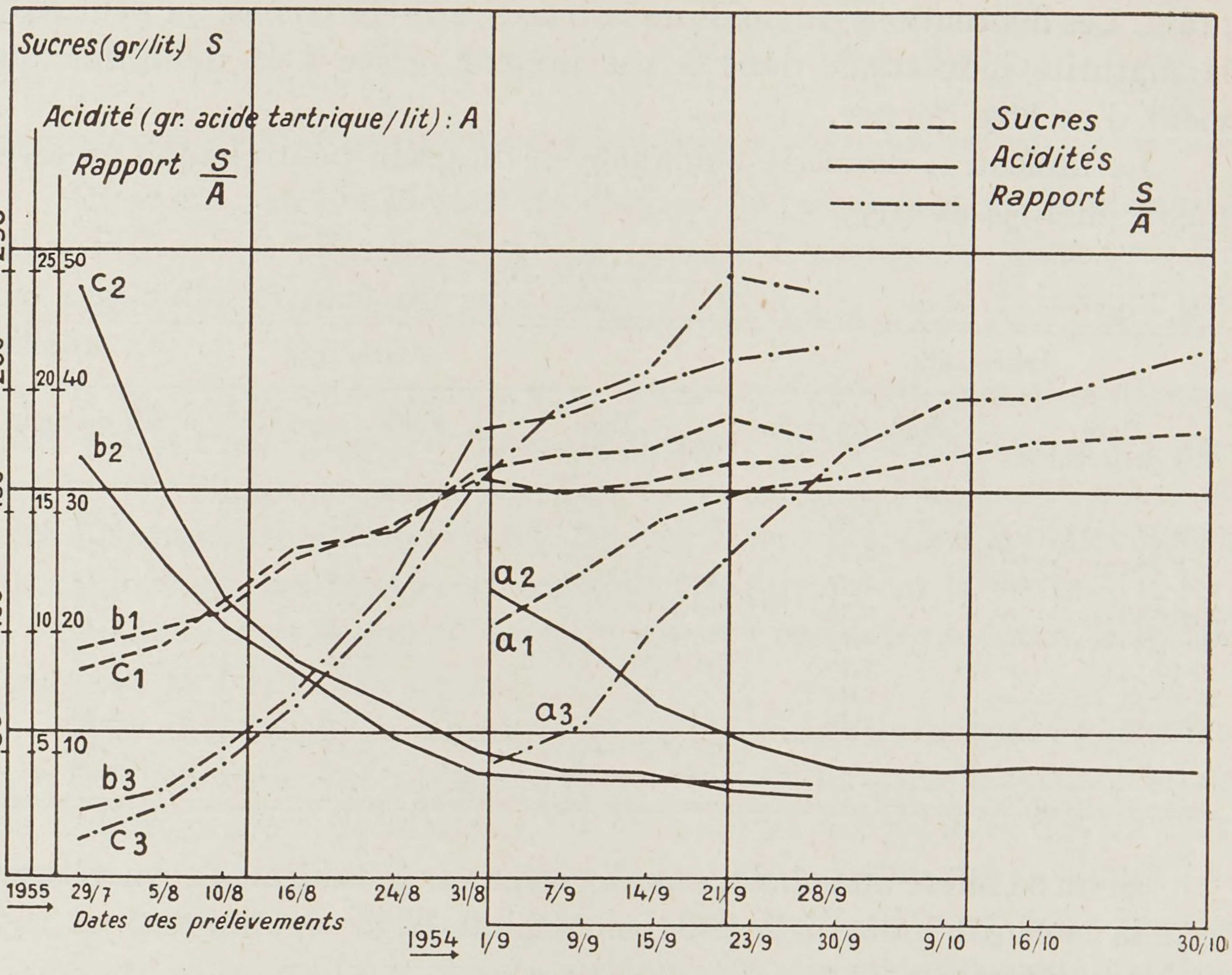
IV. — Aperçu sur la maturation du Chasselas doré de Moissac [1].

Des essais ont été faits :

En 1954 : sur une vigne productrice de Chasselas,

et en 1955 : sur deux vignobles différents complantés du même cépage.

Le résultat des trois expériences figure dans le graphique I qui groupe les variations des sucres, de l'acidité de titration. Le rapport $\frac{S}{A}$ a été calculé au cours de l'étude.



GRAPHIQUE I.

a_1, a_2, a_3 correspondent aux essais de l'année 1954.

b_1, b_2, b_3 aux essais de l'année 1955 (1ere vigne).

(1) Cette étude a été faite avec la collaboration de la Direction des Services Agricoles du Tarn-et-Garonne.

c_1, c_2, c_3 aux essais de l'année 1955 (2[e] vigne).

a_1, b_1 et c_1 représentent l'accroissement des sucres.

a_2, b_2 et c_2 la diminution des acides.

a_3, b_3 et c_3 les variations de l'indice de maturité $\frac{\text{sucres}}{\text{acidité}}$.

De l'examen de la figure ci-dessus, il résulte, en premier lieu, que 1954 a été caractérisé par un retard du début de la maturation proprement dite, ce qui est normal en raison des conditions météorologiques de l'année.

Cette réserve faite, le stade « maturité industrielle » va être déterminé à l'aide du graphique I : il se situe sur les courbes en un point à partir duquel commence un palier indiquant que les sucres cessent d'augmenter rapidement et que l'acidité ne diminue presque plus, et qui peut être placé ici à la date du 30 septembre pour l'essai *a* (1954) et du 7 septembre pour *b* et *c* (1955).

D'autres tests confirment également ces dates. D'après des travaux récents (12), ce stade de la maturation correspond au poids maximum du grain. Les fluctuations du poids de la baie ayant été notées, on peut fixer la maturité industrielle dans le cas présent, grâce à la définition qui vient d'en être donnée.

Le tableau A donne le poids moyen du grain pour chaque prélèvement, en 1954 et 1955.

TABLEAU A

Année 1954		Année 1955		
Date des prélèvements	Poids du grain (a)	Date des prélèvements	Poids du grain (b)	Poids du grain (c)
1-9-54	1,80	28-7-55	1,57	1,44
9-9-54	2,20	5-8-55	1,79	1,71
15-9-54	2,37	10-8-55	1,98	2,13
23-9-54	2,55	16-8-55	2,09	2,19
30-9-54	2,75	24-8-55	2,16	2,45
9-10-54	2,70	31-8-55	2,20	2,38
16-10-54	2,40	7-9-55	2,60	2,60
30-10-54	2,45	14-9-55	2,52	2,58
		21-9-55	2,44	2,45
		28-9-55	2,42	2,38

Si on se réfère aux chiffres qui figurent sur le tableau A, on observe que la maturité industrielle est bien atteinte le 30 septembre pour 1954 et le 7 septembre 1955.

Ces constatations sont sensiblement en accord avec les courbes des variations des sucres a_1, b_1, c_1 et de l'acidité a_2, b_2, c_2 du graphique I.

L'époque de la maturité industrielle ayant été ainsi déterminée au cours de deux années, il reste à situer la maturité gustative par rapport à la première.

V. — Remarques sur l'indice de maturité du Chasselas.

L'intervention des indices de maturité relatifs aux divers prélèvements est nécessaire ici. Le tableau B les groupe, parallèlement aux poids moyens des grains.

TABLEAU B

Date des prélèvements	1954 (a)		1955 (b)		1955 (c)	
	Poids moyen du grain	Indice de maturité	Poids moyen du grain	Indice de maturité	Poids moyen du grain	Indice de maturité
9-9-54	2,20	13,1				
15-9-54	2,37	21,3				
23-9-54	2,55	28,8				
30-9-54	2,75	35,9				
9-10-54	2,70	40,2				
16-10-54	2,40	40,4				
24-8-55			2,16	24,7	2,45	22,9
31-8-55			2,20	38,7	2,38	32,8
7-9-55			2,60	38,4	2,60	39,7
14-9-55			2,52	41,0	2,58	41,7
21-9-55			2,44	42,7	2,45	50,2

Il est aisé, en considérant ces chiffres, de remarquer que la maturité industrielle du « Chasselas Doré de Moissac » correspond dans tous les cas à un indice de maturité supérieur à 35 ainsi que cela a été indiqué par ailleurs (8).

L'aspect physique de la grappe d'une part et la dégustation d'autre part ont permis subjectivement, de préciser qu'en 1954, vers le 19 septembre, le Chasselas présentait bien les caractères d'un raisin pouvant être avantageusement consommé. De même, en 1955, c'est le prélèvement du 24 août qui remplissait les conditions requises pour la vente.

Or l'indice de maturité correspondant à ces dates se situe, dans les deux cas aux environs de 25.

Il est intéressant de constater que cette notion de maturité gustative que l'on peut concrétiser par un indice de maturité voisin de 25, dans le cas du Chasselas Doré de Moissac, est en complet accord avec des travaux importants qui avaient fixé à cette valeur la norme relative à ce cépage (9).

Le fait que ce coefficient 25 peut être appliqué pour deux années consécutives mais dissemblables au point de vue météorologique amène à conclure que l'indice relatif à la maturité gustative paraît dans le cas présent indépendant des conditions atmosphériques. Seule l'époque correspondante varie avec ce facteur. Pour les deux années, elle se place de dix à quinze jours avant la pleine maturité. En outre cette norme doit avoir assez de souplesse parce que sa valeur augmente rapidement, par-

fois de plus d'une unité par jour. C'est ce qui fait qu'on peut prévoir l'indice de 22 dans le cas de maturité tardive pour que le « Chasselas doré de Moissac » ne perde pas les avantages économiques de raisin primeur.

Résumé et conclusions.

Au cours de ce travail, la notion de maturité gustative a été définie par rapport à la maturité industrielle exigée pour un raisin de cuve.

L'étude a été faite sur le cépage « Chasselas doré de Moissac ». Des recherches sur la maturation ont permis de déduire le moment à partir duquel le raisin présentait les qualités physiques et organoleptiques requises pour être consommé.

En conclusion, pour les trois essais effectués, on a fixé ce stade de 10 à 15 jours avant la maturité industrielle de ce raisin ; c'est-à-dire avant que le grain n'atteigne son poids maximum et avant que les variations caractérisant la maturation ne soient sensiblement stabilisées.

Alors qu'au stade de maturité industrielle, le rapport $\frac{\text{sucres}}{\text{acidité}}$ est au moins égal à 35, il se situe, à la période de maturité gustative, aux alentours de 25, ce qui amène à dire que la valeur de cette norme est bien établie pour ce cépage. Cet indice de maturité permet d'avoir en début de campagne des raisins qui ont acquis le parfum et la finesse caractéristiques du cépage de qualité ayant l'appellation d'origine « Chasselas doré de Moissac ».

Reçu pour publication le 26 février 1957.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Arrêté du 1er août 1956 concernant le commerce des raisins de table. — *J. O. du 10 août 1956.*

(2) CHEVALIER (G.). — Étude de la maturité des raisins de table en vue de l'exportation et de la consommation.— *Prog. Agr. et Vit.*, **98**, 134, 1932.

(3) FERRE. — Analyse des moûts dans l'état actuel de nos connaissances et les renseignements d'ordre pratique qui peuvent en découler. *C. R.* 4e Congrès de Chimie Industrielle, septembre, nº 582, nº spécial 1925.

(4) FLANZY (M.). — Caractéristiques des raisins : raisins à vin, raisins de table et raisins à jus de fruits. *Ann. de la Nutrition et de l'alimentation*, **9**, nº 5-6, 1955.

(5) GALZY (P.) et EVESQUE (J. M.). — A propos de la maturité des raisins de table. *Ann. Techn. Agr.*, nº 3, 45, 1954.

(6) GAYON et DUBOURG. — Sur les proportions de glucose et de lévulose contenues dans les moûts de raisin. *Rev. Vit.*, 1896.

(7) HUGUES et BOUFFARD. — Sur la maturité des raisins de table. *Ann. Fals. Fr.*, nº 329, 279, 1936.

(8) LAMAZOU-BETBEDER (Mlle M.). — Observations sur la maturation des raisins et la conservation des vins de la région de Toulouse. *Bull. Agr. S. O.*, nº 331, VI, 1953.

(9) LEVADOUX (L.) de VIGUERIE (P.) et MENGAUD (L.). — Rapport des ex-

perts annexé au Jugement sur l'appellation d'origine « Chasselas doré de Moissac ». *Rev. Ministère de l'Agriculture*, n° 89, 5, 1954.

(10) Mathieu (G.). — Contrôle de la maturité des raisins de table de la région d'Avignon. *Ann. Fals. Fr.*, 355, 1936.

(11) Negre (E.). — Appréciation de la maturité des raisins de table. *Prog. agr. et Vit. T*, CXXXXII, n° 27-28, 5, 1950.

(12) Poux (Ch.). — Relation entre le poids des sucres et le poids de matières fraîches dans les raisins de différentes variétés de Vitis Vinifera au moment de la maturité. *C. R. Ac. Agr.* Fr, 36, 105, 1950.

TENEURS EN PYRIDOXINE DES VINS DE BORDEAUX

PAR

E. PEYNAUD et M^{lle} S. LAFOURCADE

Station agronomique et œnologique, Bordeaux.

Les teneurs en pyridoxine (vitamine B_6) des vins sont mal connues. On ne possède aucun document pour des vins européens. La présence des vitamines du groupe B_6 a d'abord été reconnue qualitativement dans le jus de raisin et le vin, en Californie par MORGAN et ses collaborateurs, en 1939 (1). PERLMAN et MORGAN, en 1945 (2) ont utilisé à la détermination quantitative la méthode biologique de croissance des rats et la méthode chimique de SCUDI ; sur 5 dosages, 4 chiffres sont voisins de 0,7 mg par litre, un autre atteint 1,8 mg. On sait que ces méthodes donnent des résultats trop élevés. Plus récemment, CASTOR (3) a trouvé 0,47 mg par litre pour un moût de Colombard et 0,31 mg après fermentation au laboratoire. Cet auteur utilisait la méthode microbiologique de STOCKES avec *Neurospora sitophila*.

Poursuivant notre étude analytique des vitamines hydrosolubles présentes dans les vins, qui a porté jusqu'à maintenant sur le mésoinositol (4), l'acide pantothénique (5), la cobalamine (vitamine B_{12}) (6), la riboflavine (7), la nicotinamide (8), nous avons procédé à un grand nombre de dosages de pyridoxine appliqués à des vins de Bordeaux d'âges divers. Suivant le protocole d'étude adopté dans nos travaux précédents, l'évolution de la pyridoxine a été suivie au cours de la maturation du raisin et au cours de la fermentation alcoolique ; d'autre part, on a cherché à connaître l'influence des traitements usuels des vins sur leur taux de pyridoxine.

On sait que cette vitamine, indispensable à l'homme, est liée à l'activité de systèmes enzymatiques variés, concernant surtout le métabolisme de certains acides aminés. Sa carence dans le régime alimentaire se traduit par une croissance retardée, des réactions cutanées, des convulsions. Cette vitamine étant très répandue, la déficience en pyridoxine est rare. Les besoins journaliers de l'adulte ont été fixés à 1,5 mg.

Dosage microbiologique de la pyridoxine. — La méthode de dosage la plus utilisée est celle d'ATKINS et collaborateurs (9), avec une souche de *Saccharomyces carlsbergensis*. Elle est encore décrite dans les ouvrages

spécialisés (10, 11, 12) ; voir aussi les récents travaux de FUKUI, au Japon (13, 14).

SNELL et son école (15, 16) ont montré qu'en réalité trois composés voisins, toujours présents dans les milieux végétaux et les tissus animaux, constituent le complexe B_6 : la pyridoxine, le pyridoxal et la pyridoxamine. Ces auteurs notent de grandes différences dans les réponses de certaines bactéries à ces trois formes. Mais les rapports d'activité, vis-à-vis de *Saccharomyces carlsbergensis*, de la pyridoxine aux deux autres composés, ne varient, suivant les mesures, que de 0,8 à 1,4 ; ils ont donc admis une activité grossièrement égale des trois formes de la vitamine sur la levure.

Reprenant cette question, PARRISH, LOY et KLINE (17) montrent que dans certaines conditions de température et de durée d'incubation, alors que l'activité de la pyridoxine et du pyridoxal est semblable, celle de la pyridoxamine est plus faible de 30 p. 100.

En outre, ces substances se trouvent encore dans les milieux naturels à l'état phosphorylé ; sous cette forme, elles sont beaucoup moins actives pour les levures que les dérivés non phosphorylés (18).

Quoiqu'il en soit, nous exprimerons l'activité vitaminique B_6 globale constatée en pyridoxine, en accord d'ailleurs avec la récente nomenclature qui voit dans ce terme « un nom de groupe pour désigner les dérivés de la pyridine présents dans la nature et doués d'une activité vitaminique B_6 » (19).

D'autres auteurs ont essayé pour le dosage microbiologique, des espèces de levures différentes. WILLIAMS, EAKIN et Mc MAHAN, dans une des premières études publiées (20), utilisent *Saccharomyces cerevisiae* ; BURKHOLDER (21) recommande *Saccharomyces oviformis* ; plus récemment, NEJSEL et POMOSHCHNIKOVA (22) adoptent *Saccharomycodes ludwigii.*

I. — Essais de dosage à l'aide de différentes levures.

Nous avons essayé comparativement pour le dosage de la pyridoxine la souche de *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC n° 4228 recommandée par ATKINS, la souche de *Saccharomyces oviformis* NRRL 782 préférée par BURKHOLDER, et une souche de *Saccharomyces fructuum* isolée de raisins prélevés en Médoc, et identifiée par nos soins, qui avait révélé une nette hétérotrophie vis-à-vis de la pyridoxine dans une expérimentation fixant les besoins en facteurs de croissance des levures de vin.

Nous avons tracé dans le graphique 1 les courbes de croissance en fonction de la richesse en pyridoxine, établies par des mesures néphélométriques de cultures en tubes à essais, pour une gamme de 0,005 à 0,025 µg de pyridoxine par tube, après 18 heures de culture à 35°C. Les

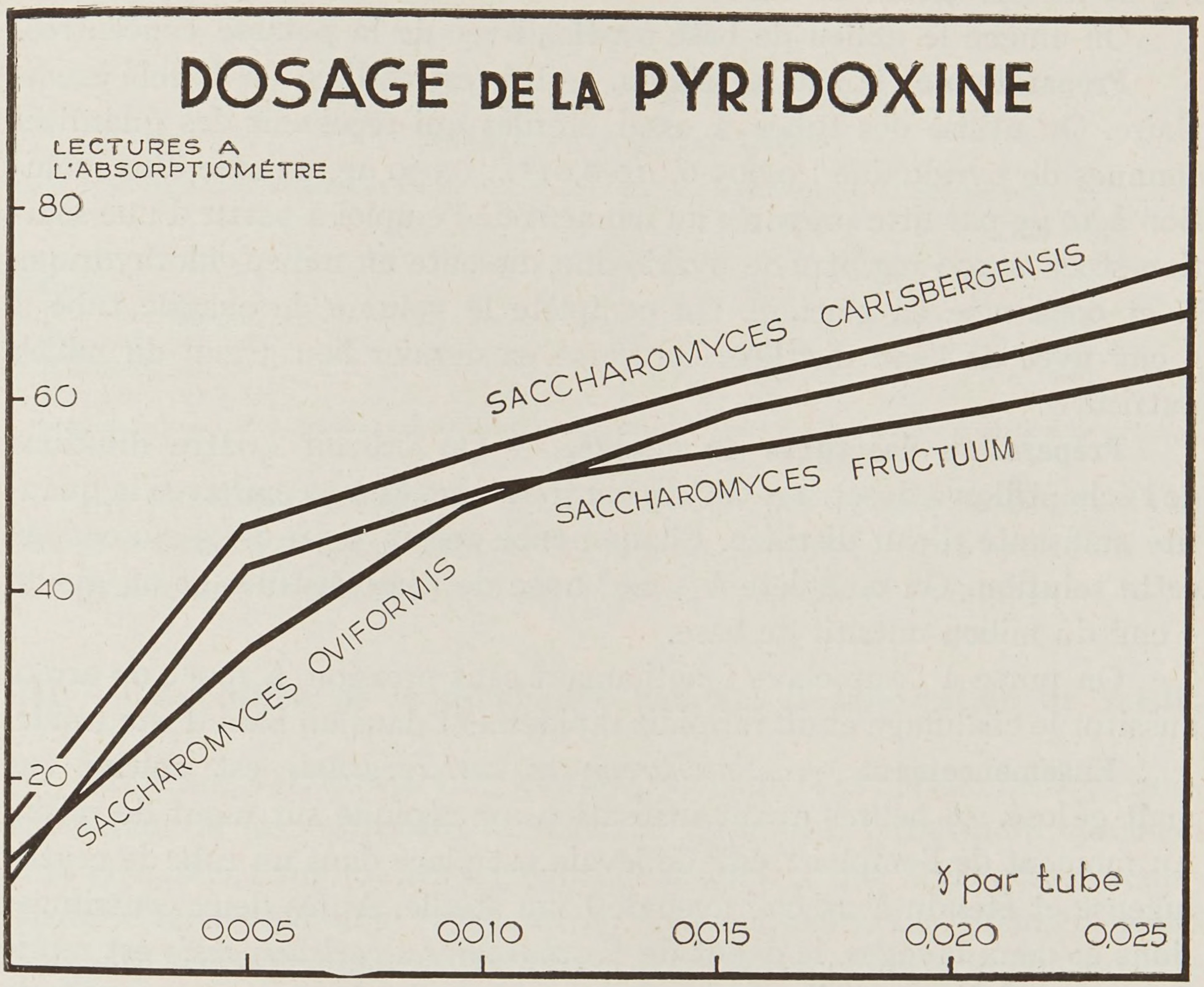
cultures ne sont pas agitées. La régularité des courbes permet une évaluation correcte de la pyridoxine. Nous avons appliqué le dosage avec ces trois levures à une série de vins ; le tableau I rapporte les résultats obtenus.

Tableau I

Dosages comparatifs de la pyridoxine avec des levures différentes.

Teneurs exprimées en mg par litre.

	Dosages effectués avec		
	Sacch. carlsbergensis	Sacch. fructum	Sacch. oviformis
Bordeaux Blanc	0,13	0,23	0,21
Graves de Cérons	0,25	0,20	0,20
Barsac	0,19	0,15	0,20
Graves	0,42	0,46	0,37
Puisseguin	0,20	0,18	0,26
Pauillac	0,11	0,20	0,23
Margaux	0,27	0,25	0,38
Margaux	0,19	0,27	0,30
Moyennes	*0,22*	*0,24*	*0,27*



Les trois levures donnent pour certains vins des valeurs assez voisines, mais on constate aussi des écarts importants. En moyenne, cependant, l'ordre de grandeur des chiffres trouvés reste le même, et ces

souches sont utilisables. *Saccharomyces carlsbergensis* fournit des chiffres un peu plus faibles, mais nettement plus réguliers. Comme cette levure a été surtout utilisée jusqu'à maintenant, nous l'adopterons dans la suite de notre étude.

II. — Mode opératoire du dosage avec Saccharomyces carlsbergensis.

Principe. — La croissance de la souche de *Saccharomyces carlsbergensis* est dans certaines conditions et entre certaines limites, proportionnelle à la concentration en pyridoxine du milieu dans lequel cette levure est cultivée. La croissance est déterminée par néphélométrie.

Milieu nutritif de base. — Pour 500 cm^3 de milieu (qui sera dilué deux fois) : glucose, 50 g ; cendres de levures, 10 g ; acide citrique, 5 g ; sulfate d'ammonium, 2 g ; asparagine, 3 g ; caséine hydrolysée à 10 p. 100, 20 cm^3 ; solution de vitamines (contenant par litre 1 mg de biotine, 10 mg de thiamine, 100 mg d'acide nicotinique et d'acide pantothénique, 1 g de mésoinositol), 20 cm^3.

On amène le milieu de base à pH 5 avec de la potasse concentrée.

Préparation de la gamme-étalon. — Elle est réalisée en double exemplaire. On utilise des tubes à essai stériles qui reçoivent des quantités connues de pyridoxine : 0,005-0,010-0,015... 0,050 µg, à l'aide d'une solution à 10 µg par litre préparée au moment de l'emploi à partir d'une solution-stock à 100 mg/litre de pyridoxine, dissoute en milieu chlorhydrique N et conservée en glacière. On complète le volume de chaque tube à 5 cm^3 avec de l'eau distillée. On verse en dernier lieu 5 cm^3 du milieu nutritif.

Préparation des tubes de dosage. — On prévoit quatre dilutions de l'échantillon à doser. 1,5 cm^3 de vin sont amenés à 50 cm^3 avec la quantité suffisante d'eau distillée. Chaque tube reçoit 0,5-1,0-1,5-2,0 cm^3 de cette solution. On complète à 5 cm^3 avec de l'eau distillée et on ajoute 5 cm^3 du milieu nutritif de base.

On porte à l'autoclave fonctionnant sans pression, à 100° ; on arrête aussitôt le chauffage et on refroidit rapidement dans un bain d'eau froide.

Ensemencement. — *Saccharomyces carlsbergensis* est cultivé sur malt gélosé. 48 heures avant utilisation, on repique sur moût de raisin. Au moment de l'emploi 1 cm^3 de levain est placé dans un tube de centrifugeuse et étendu à 25 cm^3 avec de l'eau stérile. Après deux centrifugations et deux lavages, le dépôt de *Saccharomyces carlsbergensis* est repris dans 25 cm^3 d'eau stérile. On ensemence chaque tube avec une goutte de cette suspension.

Incubation et dosage. — Les tubes sont placés dans un récipient d'eau à 35°C, maintenu à l'étuve pendant 18 heures. Nos premiers essais furent

effectués à une température de 25°, puis de 30°, et nécessitaient des temps d'incubation plus longs. Nous avons finalement adopté 35°, qui permet une croissance mesurable du soir au matin.

La croissance est déterminée à l'absorptiomètre de DOGNON. On établit une courbe standard des valeurs de l'absorption en fonction des doses de pyridoxine, qui permet de déterminer la teneur des vins étudiés.

Pyridoxine totale et pyridoxine libre. — On a vu que la pyridoxine existe dans les milieux végétaux sous forme libre et sous forme phosphorylée, hydrolysable en milieu acide. Il est connu que l'hydrolyse de cette forme combinée est paradoxalement plus rapide en milieu peu acide qu'en milieu très acide. Les deux formes de la vitamine des vins présentent un intérêt pour notre étude : la pyridoxine libre correspond à la vitamine-facteur de croissance des levures et des bactéries ; la pyridoxine totale obtenue après hydrolyse représente la valeur vitaminique alimentaire.

Pour fixer les conditions de l'hydrolyse dans le cas des vins, nous avons soumis deux vins à un chauffage à 120°C, dans diverses conditions d'acidité. Le tableau II donne les résultats obtenus.

TABLEAU II

Hydrolyse de la pyridoxine combinée.
Teneurs en mg par litre.

	Vin blanc	Vin rouge
Témoin	0,21	0,26
1 H à 120°, pH 3,0	0,33	0,32
2 H à 120°, pH 3,0	0,33	0,32
1 H à 120°, pH 1,8	0,34	0,26
2 H à 120°, pH 1,8	0,34	0,28

La pyridoxine combinée est donc libérée par simple chauffage d'une heure à 120°, à pH 3,0, c'est-à-dire le plus souvent au pH même du vin. La pyridoxine totale sera obtenue après ce chauffage préalable.

III. — Evolution de la pyridoxine pendant la maturation du raisin.

Au cours des années 1955 et 1956, on a suivi l'évolution de la pyridoxine dans le jus de raisins MERLOT et CABERNET-SAUVIGNON, prélevés aux vignobles à intervalles réguliers, de façon à ce que l'échantillon représente le mieux possible l'état moyen de la maturité. Les premiers prélèvements correspondent au moment où le raisin change de couleur. On a étudié au cours des deux années, les raisins des mêmes rangées de vignes. Le tableau III reproduit l'évolution de la pyridoxine par litre de jus de raisin ; dans le tableau IV, on a rapporté la pyridoxine à 1000 grains de raisins.

On assiste à une augmentation régulière de la pyridoxine dans le grain de raisin qui mûrit, mais parfois, et plus nettement en 1955, le taux de pyridoxine passe par un maximum 8 à 15 jours avant la maturité complète, et diminue légèrement au cours de la dernière semaine.

TABLEAU III

Evolution de la pyridoxine au cours de la maturation.
Teneurs en mg par litre de jus de raisin.

		8 Août 1955	31 Août 1955	12 Sept. 1955	21 Sept. 1955	3 Octobre 1955	
Pauillac	Merlot	0,26	0,40	0,65	0,37	—	
	Cabernet-Sauvignon	0,27	0,38	0,48	0,42	0,19	
Pessac	Merlot	0,25	0,49	0,42	0,54	0,32	
	Cabernet-Sauvignon	0,28	0,47	0,44	0,40	0,29	
		28 Août 1956	10 Sept. 1956	20 Sept. 1956	1 Octobre 1956	11 Octobre 1956	17 Octobre 1956
Pauillac	Merlot	0,27	0,27	0,25	0,33	0,33	—
	Cabernet-Sauvignon	0,18	0,23	0,28	0,39	0,30	0,34
Pessac	Merlot	0,23	0,26	0,34	0,38	0,36	—
	Cabernet-Sauvignon	0,20	0,27	0,32	0,43	0,30	—
Saint-Emilion ...	Merlot	0,19	0,27	0,26	0,29	0,31	0,23
	Cabernet-Sauvignon	0,25	0,24	0,32	0,36	0,44	0,53

TABLEAU IV

Evolution de la pyridoxine au cours de la maturation.
Teneurs en mg pour 1 000 grains de raisin.

		8 Août 1955	31 Août 1955	12 Sept. 1955	21 Sept. 1955	3 Octobre 1955	
Pauillac	Merlot	0,15	0,30	0,56	0,29	—	
	Cabernet-Sauvignon	0,14	0,23	0,27	0,25	0,16	
Pessac	Merlot	0,15	0,40	0,35	0,44	0,26	
	Cabernet-Sauvignon	0,12	0,25	0,34	0,24	0,18	
		28 Août 1956	10 Sept. 1956	20 Sept. 1956	1 Octobre 1956	11 Octobre 1956	17 Octobre 1956
Pauillac	Merlot	0,21	0,23	0,23	0,27	0,32	—
	Cabernet-Sauvignon	0,11	0,17	0,21	0,31	0,26	0,24
Pessac	Merlot	0,17	0,23	0,28	0,39	0,36	—
	Cabernet-Sauvignon	0,11	0,19	0,22	0,35	0,24	—
Saint-Emilion ...	Merlot	0,12	0,19	0,22	0,24	0,24	0,19
	Cabernet-Sauvignon	0,12	0,13	0,21	0,20	0,32	0,36

Sur 17 moûts analysés, provenant de raisins parfaitement mûrs, d'origine et de cépages différents, la pyridoxine libre a varié de 0,16 à 0,53 mg par litre, avec moyenne de 0,32 mg ; la pyridoxine totale atteint en moyenne 0,42 mg.

IV. — Comportement de la pyridoxine au cours de la fermentation alcoolique.

On a suivi l'évolution de la pyridoxine d'un moût de raisin de 12° Baumé fermentant en culture pure, à l'étuve à 25°, avec trois souches de levures de vin : *Saccharomyces ellipsoïdeus*, *Kloeckera apiculata* et *Torulaspora rosei*. Les fermentations sont conduites en flacons bouchés d'un tampon d'ouate. Les dosages sont effectués en cours de fermentation à divers intervalles, après centrifugation pour éliminer les levures en suspension.

Le graphique 2 représente l'évolution de la pyridoxine. Les trois levures ne se conduisent pas de la même façon. Avec *Saccharomyces ellipsoïdeus*, on assiste à une forte consommation dans les premières 48 heures, pendant la phase de multiplication, puis le taux remonte lentement pour arriver finalement presque au taux initial, 15 jours après l'ensemencement. Les cellules de levures recèdent au liquide une partie de la pyridoxine fixée et vraisemblablement synthétisée. *Kloeckera apiculata* fixe au début beaucoup moins de pyridoxine et le taux reste pratiquement stable après la consommation initiale. Pour *Torulaspora rosei*, la diminution se poursuit pendant tout le cours de la fermentation, et la dose restante correspond au tiers de la dose initiale, valeur beaucoup plus faible que le chiffre minimum rencontré dans les vins.

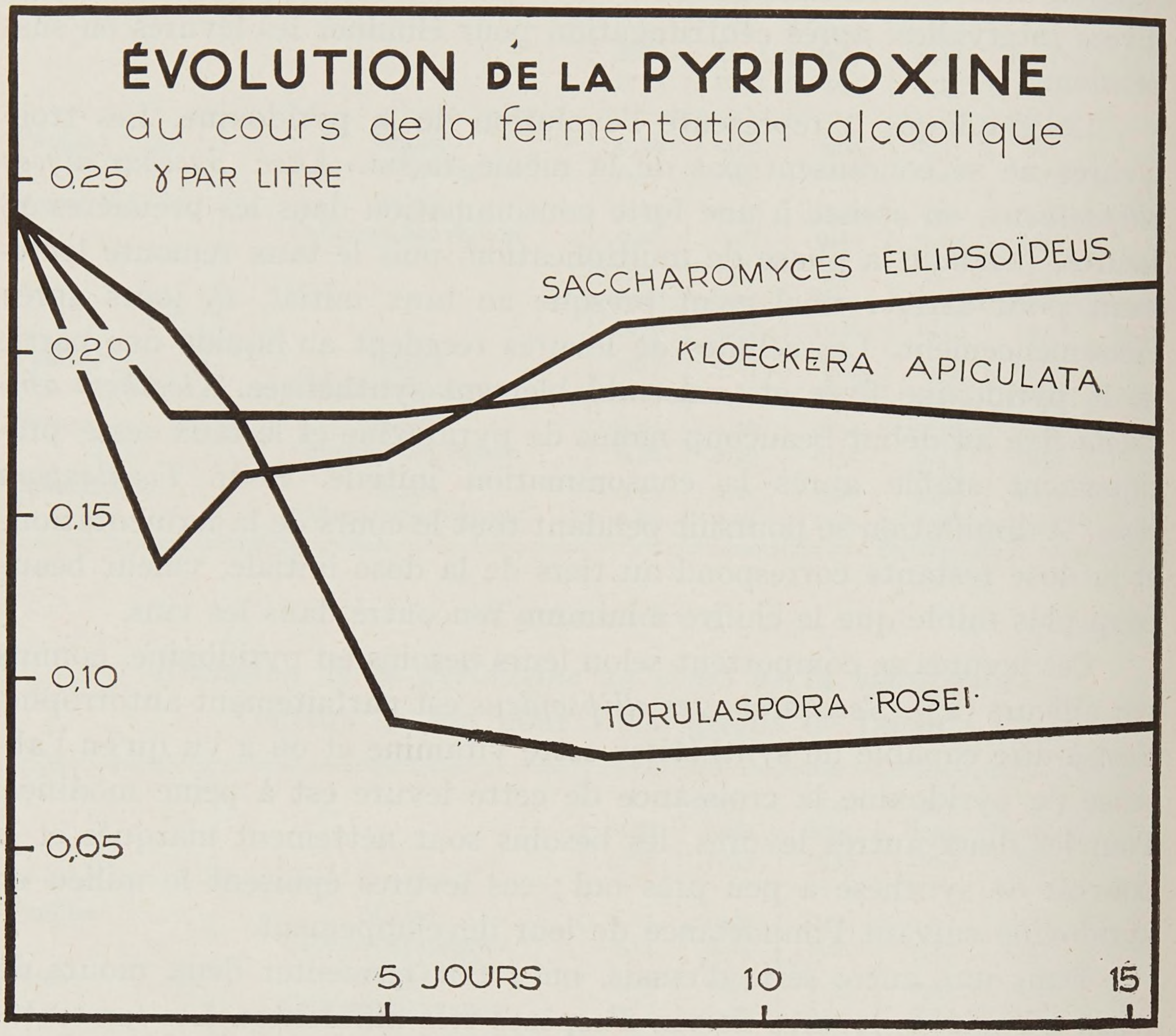
Ces levures se comportent selon leurs besoins en pyridoxine, connus par ailleurs (23). *Saccharomyces ellipsoïdeus* est parfaitement autotrophe, c'est-à-dire capable de synthétiser cette vitamine et on a vu qu'en l'absence de pyridoxine la croissance de cette levure est à peine modifiée. Pour les deux autres levures, les besoins sont nettement marqués et le pouvoir de synthèse à peu près nul ; ces levures épuisent le milieu en pyridoxine suivant l'importance de leur développement.

Dans une autre série d'essais, on a fait fermenter deux moûts de raisin à l'aide de levures de vin d'espèces très différentes. Les fermentations sont conduites à l'abri de l'air et parallèlement en flacons bouchés d'un tampon d'ouate, à la température de 25°. On dose la pyridoxine un mois après l'ensemencement. Le tableau V reproduit les valeurs obtenues.

A part *Torulaspora rosei* et, à un moindre titre, *Kloeckera apiculata*, qui consomment de la pyridoxine, tout particulièrement dans la fermentation au contact de l'air, les autres levures se montrent capables de synthétiser cette vitamine et d'en augmenter la teneur. Si le taux initial varie peu avec *Saccharomyces ellipsoïdeus* et *Pichia fermentans*, par contre *Candida pulcherrima* et *Torulopsis bacillaris* peuvent doubler et même quadrupler la pyridoxine du moût. D'autre part ces résultats con-

cordent parfaitement avec ceux des essais fixant les besoins en facteurs de croissance.

Dans les conditions de la vinification dans la pratique, où la fermentation est surtout l'œuvre de *Kloeckera apiculata* et de *Saccharomyces ellipsoïdeus*, le taux de pyridoxine du moût est finalement peu modifié, ainsi que le montrent d'ailleurs les valeurs moyennes trouvées d'une part sur les moûts (0,31 mg pour 17 dosages), et d'autre part sur les vins blancs (0,32 mg) et rouges (0,35 mg).



Les conditions de la vinification paraissent avoir assez peu d'influence sur le taux de pyridoxine. Des dosages de cette vitamine ont été effectués sur des vins rouges obtenus à partir d'une même vendange, fermentant dans diverses conditions : cuve ouverte ou fermée, chapeau flottant ou chapeau immergé, avec ou sans remontage, et avec des durées de cuvaison variant de 4 à 16 jours. Ces vins provenaient de l'expérimentation effectuée en 1955 à la cuverie d'essais de la Station, à Saint-Caprais. Les différences observées dans les teneurs en pyridoxine ne dépassent pas les erreurs possibles de dosage et peuvent être considérées comme pratiquement insignifiantes.

TABLEAU V

Influence de la fermentation alcoolique sur la pyridoxine des moûts.
Teneurs exprimées en mg par litre.

	Moût I (0,38 mg)		Moût II (0,16 mg)	
	Aérobie	Anaérobie	Aérobie	Anaérobie
Saccharomyces ellipsoïdeus	0,46	0,41	0,17	0,16
Torulaspora rosei	0,06	0,28	0,09	0,19
Kloeckera apiculata	0,32	0,37	0,20	0,25
Kloeckera magna	0,43	0,55	0,16	0,20
Torulopsis bacillaris	0,50	0,63	0,31	0,25
Candida pulcherrima	0,55	0,55	0,61	0,35
Pichia fermentans	0,42	0,40	0,14	0,15
Hansenula anomala	0,50	0,40	0,27	0,25

Dans un autre essai, on a vu l'influence de l'éraflage de la vendange et de la durée de cuvaison.

	Pyridoxine
	—
Cuvaison courte, sans rafle	0,44 mg/l
Cuvaison courte, avec rafle	0,31 «
Cuvaison longue, sans rafle	0,56 «
Cuvaison longue, avec rafle	0,39 «

La présence de rafle diminue plutôt la dose de pyridoxine. La durée de cuvaison tend à l'augmenter légèrement, mais cette observation n'est pas retrouvée dans tous les essais. Il est possible que les pellicules et les pépins contiennent proportionnellement plus de pyridoxine que le jus de la pulpe ; le fait que le vin de presse est toujours plus riche en cette vitamine le laisse supposer. Mais des évolutions microbiennes parallèles peuvent renverser l'influence des cuvaisons longues sur le taux de pyridoxine. C'est peut-être pour cette raison que les vins rouges ne se trouvent pas plus riches en cette vitamine que les vins blancs.

V. — Teneurs en pyridoxine des vins.

Nos analyses ont porté sur 89 vins de Bordeaux, soit 31 vins blancs et 58 vins rouges. Les résultats font l'objet des tableaux VI et VII.

Les teneurs en pyridoxine libre varient de 0,12 à 0,67 mg, avec moyenne générale de 0,31 pour les vins blancs. La pyridoxine totale de ces mêmes vins est nettement plus élevée et va de 0,22 à 0,82, avec moyenne de 0,44 mg.

Pour les vins rouges, les teneurs vont de 0,13 à 0,68 mg, avec moyenne de 0,35 pour la fraction libre de la vitamine, et de 0,25 à 0,78 avec moyenne de 0,47 mg pour la pyridoxine totale. Elles sont donc du même ordre de grandeur dans les deux catégories de vins.

Tableau VI

Teneurs en pyridoxine des vins blancs de Bordeaux.
Exprimées en mg par litre.

Appellation et origine du vin	Observations	Pyridoxine libre	Pyridoxine totale
Bordeaux 1953	12° sec	0,38	
Bordeaux	10° + 27 g sucre	0,54	
Bordeaux		0,20	0,34
Côtes de Blaye	sec	0,13	
Entre-deux-mers	12°6	0,43	
Entre-deux-mers	13°5	0,30	
Premières côtes de Bordeaux		0,25	
Cadillac 1955		0,40	
Graves		0,18	0,22
Graves supérieures	13° + 5 g sucre	0,28	
Graves supérieures		0,32	
Côtes de Montravel (Dordogne)		0,20	0,37
Loupiac		0,19	0,27
Loupiac		0,12	
Sainte-Croix-du-Mont 1953	13°5 + 1°5	0,21	
Sainte-Croix-du-Mont 1953	14°2 + 2°5	0,16	
Sainte-Croix-du-Mont 1953	14°5 + 3°1	0,43	
Sainte-Croix-du-Mont		0,26	
Cérons		0,25	
Barsac		0,45	
Sauternes		0,42	
Barsac 1947		0,32	
Fargues 1947		0,28	0,47
Barsac 1950		0,31	0,51
Barsac 1950		0,31	
Fargues 1950		0,12	
Barsac 1953		0,34	0,38
Barsac 1953		0,22	0,42
Barsac 1955		0,43	0,58
Barsac 1955		0,37	
Barsac 1955		0,67	0,82

Ces doses, voisines d'un demi-milligramme par litre, ne sont nullement négligeables, puisqu'on admet que les besoins journaliers de l'adulte s'élèvent à 1,5 ou 2 mg.

Le vieillissement le plus prolongé, en fût de bois ou en bouteille, n'affecte pas la teneur en pyridoxine, mais certains traitements courants ne sont pas sans diminuer nettement cette teneur. Le tableau VIII montre que les collages classiques effectués à la gélatine, au blanc d'œuf ou l'albumine de sang éliminent un peu de pyridoxine. Mais ce sont surtout les traitements adsorbants, utilisant les bentonites, les charbons, la terre d'infusoires, qui dépouillent les vins de cette vitamine, proportionnellement moins cependant qu'ils ne le font pour la riboflavine. L'action de l'oxygénation est difficile à interpréter car les vins longuement vieillis conservent leur pyridoxine ; ou bien il faut penser qu'une oxydation lente n'a pas les mêmes effets à ce sujet qu'une oxydation brutale.

TABLEAU VII

Teneurs en pyridoxine des vins rouges de Bordeaux.
Exprimées en mg par litre.

Appellation et origine du vin		Pyridoxine		Appellation et origine du vin	Pyridoxine	
		Libre	Totale		Libre	Totale
Vins très vieux				*Vins de presse*		
Cantenac	1899	0,27	0,38	Margaux 1454, vin de goutte	0,42	
Margaux	1899	0,44		« vin de presse	0,68	0,72
Pauillac	1900	0,46		Pessac 1952, vin de goutte	0,30	
Pauillac	1911	0,44	0,56	« vin de presse	0,34	
Cantenac	1920	0,19		Pessac 1953, vin de goutte	0,42	
Vins de crus				« vin de presse	0,60	
Château L. Pauillac	1934	0,27		Cantenac 1953, vin de goutte	0,49	
« « «	1945	0,24		« vin de presse	0,62	
« « «	1947	0,13		*Appellation génériques en*		
« « «	1949	0,33		*bouteilles.*		
« « «	1950	0,18	0,25	Bordeaux	0,30	0,42
« « «	1953	0,32		Bordeaux-Clairet	0,25	
Château L. B. Pauillac	1938	0,30		Premières Côtes de Blaye	0,31	
« « «	1940	0,35	0,48	Premières Côtes de Blaye	0,27	
« « «	1942	0,32		Côtes de Bourg	0,25	
« « «	1943	0,38		Premières Côtes de Bordeaux	0,56	0,78
« « «	1945	0,34		Côtes de Fronsac	0,37	
« « «	1947	0,35		Côtes de Canon-Fronsac	0,53	
Château F. Saint-Emilion	1951	0,38		Puisseguin Saint-Emilion	0,20	
« « «	1952	0,31	0,45	Lussac-Saint-Emilion	0,26	0,29
« « «	1953	0,48	0,57	Montagne-Saint-Emilion	0,31	
Château P. Margaux	1952	0,35		Saint-Georges-Saint-Emilion	0,30	0,32
« « «	1953	0,44		Sables-Saint-Emilion	0,34	
« « «	1954	0,42	0,60	Saint-Emilion	0,42	0,55
Château B. Saint-Julien	1953	0,45		Saint-Emilion	0,27	
Château P. Saint-Emilion	1953	0,51	0,66	Lalande-de-Pomerol	0,28	
Château CF Saint-Emilion	1952	0,33		Pomerol	0,27	
« « «	1953	0,40		Pomerol	0,31	
				Médoc	0,35	
				Haut-Médoc	0,24	
				Saint-Estèphe	0,28	
				Margaux	0,37	0,42
				Pauillac	0,11	

TABLEAU VIII

Influence des divers traitements des vins sur leur teneur en pyridoxine libre.
Exprimée en mg par litre.

Traitements effectués		Vin blanc	Vin rouge
Témoin		0,45	0,24
Collages :			
Colle de poisson	25 mg/l	0,43	—
Caséine	250 mg/l	0,38	—
Ferrocyanure de potassium	100 mg/l	0,45	—
Albumine de sang	200 mg/l	0,32	0,18
Gélatine	150 mg/l	—	0,12
Blanc d'œuf	150 mg/l	—	0,18
Oxygénation		0,33	0,13
Terre d'infusoires	1 000 mg/l	0,19	0,17
Charbon végétal	200 mg/l	0,25	0,21
Bentonite A	500 mg/l	0,27	0,16
Bentonite F	1 000 mg/l	0,25	0,13

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) MORGAN (A. F.), NOBLES (H. L.), WIENS (A.), MARSH (G. L.) et WINCKLER (A. J.). — The B vitamins of California grape juice and wines. *Food Research,* **4,** 217, 1939.

(2) PERLMAN (L.) et MORGAN (A. F.). — Stability of B Vitamins in grape juice and wines. *Food Research,* **10,** 334, 1945.

(3) CASTOR (J. G. B.). — The B. complex vitamins of mustes and wines as microbial growth factors. *Applied Microb.,* **1,** 97, 1953.

(4) PEYNAUD (E.) et LAFOURCADE (S.). — L'inositol dans les raisins et dans les vins. Son dosage microbiologique. *Ann. Technol. Agric.,* **4,** 381, 1955.

(5) PEYNAUD (E.) et LAFOURCADE (S.). — L'acide pantothénique dans les raisins et dans les vins de Bordeaux. *Ind. Agric., alim.,* **72,** 575 et 665, 1955.

(6) PEYNAUD (E.) et LAFOURCADE (S.). — Sur la présence de vitamine B_{12} dans les vins. *C. R. Acad. Sci.,* **241,** 127, 1955.

(7) PEYNAUD (E.) et LAFOURCADE (S.). — Sur la teneur des vins en riboflavine. *Rev. Ferm. Ind. Alim.* (Bruxelles), **12,** 9, 1957.

(8) LAFOURCADE (S.). — Dosage de la nicotinamide dans les vins de Bordeaux. *Ind. Agric. Alim.,* **73,** 779, 1956.

(9) ATKIN (L.), SCHULTZ (A. S.), WILLIAMS (W. L.) et FREY (C. N.). — *Ind. Eng. Chem. Anal. ed.,* **15,** 141, 1943.

(10) JOHNSON (B. C.). — *Methods of vitamin determination,* Burgess Publis Co Minneapolis, 1948.

(11) WELSCH (M.). — *Le dosage microbiologique des vitamines.* Masson éd., Paris, 1947.

(12) *Methods of vitamin assay.*— The association of vitamin Chemists, Interscience Publis., New-York, 1951.

(13) FUKUI (S.), KISHIBE (T.) et TANI (Y.). — The microbiological assay of vitamin B_6. *Vitamins* (Japon), **6,** 436-439, 1953.

(14) FUKUI (S.), SAKAMOTO (T.) et TANI (Y.). — A microbiological assay method for vitamin B_6, biotin, inositol and panthothenic acid using Saccharomyces carlsbergensis. *Vitamins* (Japon), **8,** 218-223, 1955.

(15) SNELL (E. E.). — *Journ. Biol. chem.,* **154,** 313, 1944.

(16) SNELL (E. E.), RANNEFELD (A. N.). — *Journ. biol. chem.,* **157,** 475, 1945.

(17) PARRISH (W. P.), LOY (H. W.) et KLINE (O. L.). — A study of the yeast method for vitamin B_6. *Journ. Assoc. off. Agric. chem.,* **38,** 506, 1955.

(18) RABINOWITZ (J. C.) et SNELL (E. E.). — *Anal. Chem.,* **19,** 277, 1947.

(19) COURTOIS (J. E.). — La nomenclature des vitamines et des stéroïdes. *Bull. Soc. Chim. biol.,* **38,** 295, 1956.

(20) WILLIAMS, EAKIN et MC MAHAN. — *Univ. Texas Pull.,* nº 4137, 24, 1941.

(21) BURKHOLDER. — *Amer. Journ. Bot.,* **30,** 206, 1943.

(22) NEJSEL (M. N.) et POMOSHCHONIKOVA (N. A.) (en russe).— Une méthode microbiologique simple pour le dosage de la pyridoxine (vitamine B_6), *Biokhimija,* **17,** 593, 1952.

(23) LAFOURCADE (S.). — *Contribution à l'étude des activeurs et des inhibiteurs de la fermentation alcoolique des moûts de raisin.* Thèse Ingénieur-docteur, Bordeaux, 1954. *Ann. Technol. agric,* **3,** 308, 1954.

MODIFICATIONS DU POTENTIEL OXYDOREDUCTEUR AU COURS DE L'ÉLABORATION DES VINS DE DIFFÉRENTS TYPES

PAR

L. DEIBNER

Station centrale de Technologie végétale, Narbonne.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Avant-propos.

II. — Différents types de vins, leurs classifications.

III. — Évolution du potentiel en fonction des procédés d'élaboration des vins.

A. — Élaboration des vins basée uniquement sur la fermentation des moûts de raisin.

a) Substances oxydoréductrices du moût de raisin, leurs transformations.

b) Vinification, ses stades.

c) Modification du potentiel au cours de la vinification en fonction des facteurs oxydo-réducteurs.

1°) Vinification en blanc.

2°) Vinification en rouge.

B. — Elaboration des vins mousseux par fermentation alcoolique produite dans les vins secs enrichis en sucre.

a) Détermination électrométrique du potentiel.

b) Fabrication en bouteilles.

c) Fabrication en cuves closes.

C. — Elaboration des vins oxydés.

a) Par les levures au stade oxydatif.

b) Par le traitement thermique en présence de l'air.

I. — AVANT-PROPOS

En 1955 M. Joslyn, professeur de Food Technology à l'Université de Californie, nous a proposé de présenter pour la réunion de juin 1956 de « l'American Society of Enologists » un vaste rapport intitulé « Changes in oxidation-reduction potentiel during the course of the production and aging of wine ».

Il nous a été possible de rédiger ce mémoire. Toutefois, en raison des différentes circonstances, indépendantes de notre volonté, sa présentation à

ladite réunion ainsi que sa publication dans « American Journal of Enology » n'ont pu être réalisées. Entre autres, il faut mentionner la difficulté de traduire ce rapport en anglais surtout au point de vue financier.

Dans ces conditions, il a été décidé que ce travail serait publié dans les « Annales de Technologie Agricole » sous forme de trois mémoires, à savoir :

— Modification du potentiel oxydoréducteur au cours de l'élaboration des vins de différents types.

— Evolution du potentiel au cours de la maturation des vins.

— Effets des différents traitements sur le potentiel oxydoréducteur des vins.

II. — DIFFÉRENTS TYPES DE VINS, LEURS CLASSIFICATIONS

L'étude des modifications du potentiel oxydoréducteur au cours de l'élaboration des vins est un vaste sujet en raison de l'existence de différents types de ces boissons.

La majorité des classifications connues des vins est surtout basée sur leur composition en tenant principalement compte du degré, de la teneur en sucre, en anhydride carbonique.

En général, on distingue quatre catégories de vins (1).

1° Vins de table.

2° Vins de dessert alcoolisés.

3° Vins de dessert doux.

4° Vins mousseux.

Souvent on emploie les vocables « vins spéciaux » ou « vins spécialisés » pour désigner les trois dernières catégories.

D'après PROSTOSSERDOV (2), cette classification n'est pas basée sur un principe bien déterminé. En effet, le terme « Vins de table » indique leur destination, les autres désignations se rapportent à la composition des vins ou à leurs propriétés.

Cet œnologue a proposé un schéma délimitant les vins suivant le bilan de la fermentation alcoolique de leurs moûts : les vins caractérisés par le bilan non perturbé (vins secs, légers ou forts) et les vins avec le bilan perturbé de différentes manières. L'auteur de cette classification ne la considère pas comme complète.

GUERASSIMOV (3) a proposé une classification basée sur la technologie des vins. Le premier groupe comprend les vins *naturels*, obtenus par la fermentation du jus de raisin sans addition aucune. Les vins *améliorés* constituent le deuxième groupe ; ce sont les vins additionnés d'alcool, de sucre, saturés en anhydride carbonique. A leur tour, chaque groupe comporte deux classes : vins de table, vins de dessert.

Pour AGABALIANTZ (4) toutes ces classifications n'ont aucune valeur scientifique et pratique puisqu'elles ne mettent pas en relief les caractéristiques naturelles des vins. La classification rationnelle des vins doit s'appuyer sur les particularités de leur composition ; en particulier, l'état d'oxydation de ces boissons (teneur en acétaldéhyde) constitue un critère important lors de l'établissement de leur systématique.

Actuellement, nous disposons d'une classification internationale acceptée par tous les pays adhérents à l'Office International du Vin (5).

Cette classificaton précise que toute addition de nature alcoolique ou glucidique et, d'une façon générale, toutes additions qui modifieraient le caractère

générique du vin donnent naissance à un vin spécial. Les catégories des vins spéciaux sont les suivantes :

Vins spiritueux doux.
Vins spiritueux secs.
Vins liquoreux.
Vins aromatisés.
Vins mousseux et vins gazéifiés.

III. — EVOLUTION DU POTENTIEL EN FONCTION DES PROCÉDÉS D'ÉLABORATION DES VINS

Pour faciliter l'exposé de ce mémoire, nous avons adopté la classification des vins suivant les procédés technologiques utilisés pour leur élaboration. Ces procédés peuvent être répartis en trois groupes :

1° L'élaboration des vins ne subissant, après la fin de la fermentation alcoolique des moûts, aucun traitement destiné à modifier leurs caractéristiques.

2° L'élaboration des vins mousseux, par fermentation alcoolique répétée au sein des vins issus de la fermentation primaire et enrichis en sucre (champagnisation).

3° L'élaboration des vins oxydés à partir des vins issus de la fermentation primaire, à l'aide des levures au stade oxydatif (jérézation) ou au moyen d'un traitement approprié (madérisation).

A. — ÉLABORATION DES VINS BASÉE UNIQUEMENT SUR LA FERMENTATION DES MOUTS DE RAISIN

L'étude des modifications du potentiel oxydoréducteur au cours de la fermentation du moût de raisin ne peut être profitable qu'à condition de la lier aux recherches simultanées concernant les changements chimiques du milieu. Avant d'exposer l'essentiel de quelques travaux plus ou moins systématiques, répondant à la condition énoncée, il nous semblait utile de préciser l'état de nos connaissances relatives aux propriétés oxydoréductrices du moût et aux phases de la vinification. Nous signalons que tous les résultats des mesures potentiométriques, citées dans ce mémoire, seront toujours rapportés à l'électrode normale d'hydrogène.

a) Substances oxydoréductrices du moût de raisin, leurs transformations.

Le jus de raisin possède des propriétés réductrices. Etalé en couche mince ou agité quelque temps au contact de l'air, le jus de raisin blanc s'oxyde, en brunissant.

Les premières phases du brunissement, dû à l'oxydation de substances phénoliques, sont réversibles : par addition de l'acide ascorbique et de la cystéine, la couleur disparaît (6).

Les substances oxydables du moût et du vin ont été étudiées tout particulièrement par RODOPOULO (7) et DOURMISCHIDZÉ (8). Les résultats d'une partie des travaux de ces œnologues ont été indiqués dans nos mémoires publiés dans la « Revue des Fermentations et des Industries Alimentaires » (9). Le moût de raisin contient des enzymes oxydatifs (polyphénoloxydase et peroxydase), dont l'activité provoque l'oxydation des polyphénols et des substances

tanniques, d'où la formation de corps colorés d'une nature non encore établie. RODOPOULO a effectué une série d'essais avec les jus de raisin blancs (Tchinouri, Gorouli-Mtzvané, Aligote) laissés au contact de l'air au cours de la période précédant la fermentation Les dosages des substances tanniques totales, de leurs fractions hydro-solubles et éthérosolubles, des substances du type quinones, de l'acide ascorbique ont été accompagnés des mesures du potentiel oxydoréducteur. Le tableau I présente les résultats obtenus (*op. cit.* (7-*b*) p.216).

TABLEAU I

Modifications des teneurs des substances tanniques dans le jus de raisin sous l'action de la polyphénoloxydase.

Temps des dosages	Substances tanniques en ml K Mn O^4-N/10			Quinones mg/litre	Acide ascorbique mg/litre	E_H mV	Couleur des jus
	Teneur totale	Fraction hydro-solubre	Fraction soluble dans l'éther				
Au moment du pressurage du raisin ...	5,9	4,0	1,9	0	10,5	+ 325,6	Verdâtre
1 heure après	5,4	—	—	0,5	1,3	385,7	Faiblement brun
3 « «	4,8	—	—	4,5	0,8	425,7	Brun
6 « «	4,2	—	—	6,7	8,3	451,8	Brun foncé
12 « «	3,6	3,2	0,5	10,5	traces	475,3	Brun intense

On constate que le jus fraîchement obtenu ne contient pas de quinones ; leur formation s'effectue surtout aux dépens de la fraction éther-soluble des substances tanniques, composée des polyphénols et des catéchines. La concentration des quinones est faible au début en raison de la présence de l'acide ascorbique réduisant les quinones formées. Les substances tanniques jouent le rôle de transporteurs d'hydrogène au cours de l'oxydation biologique du jus de raisin. La disparition de l'acide ascorbique coïncide avec l'augmentation de la teneur en quinones et avec l'augmentation du potentiel d'oxydoréduction. Toutefois, le bilan des polyphénols oxydés et des quinones formées montre l'existence de la polymérisation de ces dernieres ce qui détermine l'apparition de la coloration dans le jus. RODOPOULO a contaté également que le premier stade de brunissement — du vert au brun — est réversible : l'addition d'acide ascorbique, jouant le rôle de réducteur des quinones, annihile la formation de la coloration brune. Dans le jus de raisin 25 p. 100 de l'acide ascorbique sont oxydés à l'aide de l'ascorbinase ; cette oxydation est accompagnée de la formation de peroxyde d'hydrogène (jusqu'à 10 gammas par litre), d'ailleurs, décomposé par la catalase du jus. Le potentiel du jus de raisin fraîchement préparé est de + 325,6 *m*V en raison de la présence des substances oxydables (acide ascorbique, par exemple) ; nous avons vu que les principales substances subissant en premier lieu l'action de l'oxydation, appartiennent aux substances tanniques ; d'ailleurs, le potentiel de + 475,3 *m*V caractérise le système oxydoréducteur : quinone $\rightleftarrows$ hydroquinone. L'accumulation des quinones au cours de l'oxydation du jus de raisin par l'oxygène de l'air a été également observée par DOURMISCHIDZÉ (*op. cit.* (8) p. 168). Cet œnologue a mesuré l'absorption de l'oxygène dans les jus de raisin en absence ou en présence de la pulpe pour les différents cépages. Le tableau II donne l'idée de la différence marquée entre l'absorption pour le jus, pauvre en enzymes et celle en présence

de la pulpe, riche en enzymes oxydants ; il existe aussi une différence entre les sortes de raisin.

TABLEAU II (*op. cit.* (8) p. 164).

Absorption de l'oxygène par le jus de raisin fraîchement obtenu.

Sorte de raisin	Absorption d'oxygène en ml par litre pour 1 heure		
	Jus filtré à l'abri de l'air	Jus bouilli dans l'atmosphère de CO_2	Jus + pulpe
Saperavi	1,7	1,2	31,6
Rkaziteli	2,0	1,0	20,0
Mtzvané	1,2	0,9	39,1

KOULNEVITCH (10) a déterminé le bilan des différentes formes de l'oxygène (moléculaire dissous et actif) dans le moût de raisin PINOT GRIS en liaison avec les déterminations du potentiel oxydoréducteur.

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau III.

TABLEAU III

Moût, son état	Oxygène mg/litre			Potentiel E_H *m*V
	Indice d'oxygène O_t	Indices des peroxydes O_p	Indice d'oxygène O_d	
Moût (1re pression)	2,5	2,3	0,20	+ 415
« après filtration	—	4,4	—	—
« après repos de 5 h	4,10	3,6	0,5	440
« après repos de 20 h et filtration.	7,45	4,30	3,15	—
« après sulfitation et repos de 20 h	1,30	1,20	0,10	300
« après 4 jours de fermentation.	0,10	0,10	0	205

On constate que le moût possède un indice des peroxydes élevé et contient peu d'oxygène dissous en raison de son utilisation rapide par les enzymes. L'indice des peroxydes ne dépasse pas une limite déterminée même après une aération prolongée. Après la sulfitation (l'auteur ne précise pas les doses de l'anhydride employées) l'indice des peroxydes diminue sans être annulé ce qui démontre l'existence des peroxydes réfractaires à l'action de ce réducteur.

RODOPOULO (*op. cit.* (7-*a*) p. 22) a comparé les modifications du potentiel et des indices chimiques d'un moût non sulfité et sulfité. Le moût vierge absorbe avidement l'oxygène : 3,25 ml par litre pendant la première heure ; le potentiel augmente de + 320 *m*V à + 389,6 *m*V.

Le moût sulfité, 100-105 mg d'anhydride par litre, s'oxyde moins vite ; son potentiel augmente lentement ; les teneurs en tanin et en acide ascorbique diminuent très peu. Il est possible donc de diriger l'oxydation des substances oxydables et, en premier lieu, des substances polyphénoliques par l'utilisation des réducteurs comme l'acide ascorbique et l'anhydride sulfureux, ce qui est bien connu.

Le tableau IV présente les résultats des essais de RODOPOULO sur une forme condensée.

TABLEAU IV

(*d'après le tableau I de* RODOPOULO)

Indices	Au moment du pressurage	Après 1 heure	Après 3 heures	Après 6 heures	Après 12 heures
	Moût non sulfité				
Potentiel (mV)	320,5	389,6	415,6	435,6	454,5
Oxygène absorbé (ml/l)	—	3,25	5,2	6,32	7,27
Tanin (ml $KMnO_4$ N/10)	5,9	5,4	4,8	4,2	3,6
Quinones (mg/l)	0	0,6	4,5	6,7	10,5
Acide ascorbique (mg/l)	12,5	2,5	0,8	0,5	0,3
	Moût sulfité				
Potentiel (mV)	320,5	345,7	355,8	375,6	385,7
Oxygène absorbé (ml/l)	—	0,75	1,0	1,35	1,51
Tanin (ml $KMnO_4$ N/10)	5,9	5,8	5,8	5,7	5,7
Quinones mg/l	0	0	0	0	0,5
Acide ascorbique (mg/l)	12,5	10,2	9,9	9,5	9,3

Il est facile de comprendre les causes de la faiblesse des teneurs de l'acide ascorbique dans les vins ; l'addition d'anhydride sulfureux, protégeant la couleur, diminue l'oxydation de cet acide par inactivation des enzymes oxydants. D'ailleurs, l'activité de ces enzymes dans le jus avant la fermenttion alcoolique délimite une phase spéciale de la vinification, comme nous allons le voir dans ce qui suit.

b) **Vinification, ses stades.**

La vinification constitue un ensemble de phénomènes depuis le traitement du raisin aux fins de libérer le moût jusqu'à la complète formation du vin en passant par la macération et la fermentation. Le rôle de la macération étant défini au point de vue physicochimique (11), l'observation a permis de distinguer pendant le cuvage, c'est-à-dire la période au cours de laquelle ce moût est dans la cuve, trois phases distinctes : préfermentation, fermentation tumultueuse, fermentation complémentaire et post-fermentation (12).

Malgré la signification pratique bien reconnue des procédés du traitement du raisin, les réactions d'oxydation s'effectuant au cours de ce traitement, n'ont pas fait dans le passé l'objet de recherches spéciales.

D'après DOURMISCHIDZÉ (*op. cit.* (8) p. 164) la période entre l'écrasement du raisin et le début de fermentation alcoolique constitue une étape importante de l'œnotechnologie ; en raison de son caractère enzymatique cette période est désignée sous le terme « stade enzymatique du raisin et de son jus ». Il ne nous est pas possible de présenter ici un exposé des résultats des recherches de DOURMISCHIDZÉ sur les transformations des substances tanniques au cours de cette période enzymatique. Faut-il encore le compléter par un autre exposé concernant les enzymes du raisin et du vin étudiées, en particulier, par RODOPOULO et DOURMISCHIDZÉ. Nous pouvons seulement signaler que le caractère de l'oxydation enzymatique dépend des procédés du traitement du raisin, de la composition mécanique et chimique de la grappe, de l'activité des enzymes, du degré de la destruction des cellules de la grappe, de la température, des conditions d'aération et de la durée du stade enzymatique.

L'oxydation enzymatique des substances tanniques du raisin est un processus complexe s'effectuant en fonction de leur composition, de la présence

d'autres substances oxydables, aminoacides, oxyacides organiques, par exemple.

L'oxydation des substances tanniques et colorantes, ayant lieu avant le pressurage ou après, au début ou à la fin de la fermentation alcoolique, déterminent les conditions spécifiques pour l'appariton des processus oxydatifs secondaires. Le déroulement ultérieur de la vinification est conditionné par ses deux premiers stades : traitement du raisin, oxydation enzymatique des substances du jus. On peut admettre sans difficulté que le processus de la vinification comprend quatre stades principaux :

— stade du traitement de raisin,
— stade enzymatique,
— stade de fermentation alcoolique,
— stade post-fermentation.

Nous avons vu précédemment les particularités de l'évolution du potentiel au cours du stade enzymatique. Dans ce qui suit d'autres stades seront étudiés au point de vue qui nous intéresse et ceci dans la mesure des possibilités offertes par l'état actuel des connaissances correspondantes.

c) Modifications du potentiel au cours de la vinification en fonction des facteurs oxydoréducteurs.

C'est un fait bien connu qu'au cours de la fermentation alcoolique d'une solution de glucides le potentiel d'oxydoréduction diminue rapidement au début de ce phénomène et ensuite se stabilise à une valeur suffisamment basse, appelée potentiel limite. La fermentation des jus de raisin suit, bien entendu, cette règle. Toutefois, des mesures électrométriques du potentiel dans ces jus, destinées à étudier son évolution d'une manière systématique, ne sont pas nombreuses. Nous exposerons d'abord les résultats obtenus au cours de la vinification en blanc et ensuite ceux relatifs à la vinification en rouge.

1° Vinification en blanc.

La priorité des premières mesures électrométriques dans les jus de raisin revient à Garino-Canina (13). Le potentiel d'un moût de pH 3,3 est descendu au bout d'un mois de + 424 *m*V à + 60 *m*V ; Joslyn et Dunn (14) ont montré que le potentiel atteint la valeur de + 60 ± 100 *m*V au bout de 25 H environ. Citons encore les résultats observés par Joslyn (15) au cours de la fermentation d'un jus de Tokay, à la température de + 24°C.

	pH	E_H mV
	—	—
Au remplissage	3,93	+ 409
Début de fermentation	3,65	+ 205
Fermentation active	3,65	— 10
Fin de la fermentation	3,78	+ 40

Revenons à présent aux essais de Rodopoulo (*op. cit.* (7-*c*) p. 22-23) et voyons leur suite. Le tableau IV nous a montré les modifications du potentiel et les transformations chimiques dans les moûts sulfités et non sulfités pendant la période enzymatique précédant la fermentation alcoolique. Au cours de cette dernière, le potentiel baisse et l'oxygène est rapidement utilisé par les levures ; après le soutirage le potentiel et la teneur en oxygène absorbé augmentent, ce que précisent les résultats consignés dans le tableau V.

TABLEAU V

Époque des déterminations	Mout non sulfité		Mout sulfité	
	E_H mV	Oxygène absorbé ml/litre	E_H mV	Oxygène absorbé ml/litre
Avant l'introduction des levures ..	+ 460,0	4,5	+ 386,0	1,15
Après l'introduction des levures...	410,5	2,25	345,6	0,65
Aprés 3 jours..................	205,6	0	200,6	0
Après 6 jours..................	135,6	0	135,6	0
Après 12 jours.................	145,6	0	140,8	0
Après le soutirage.............	325,6	2,5	205,6	0,8

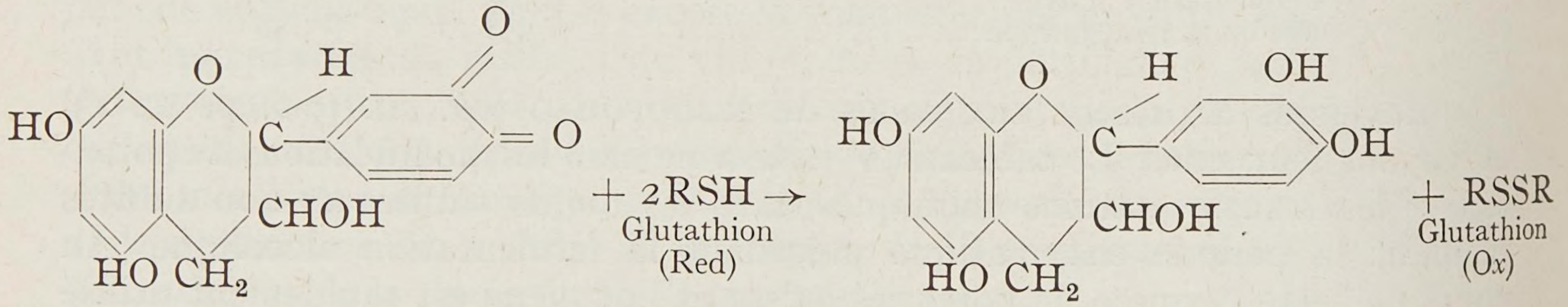
Il résulte de l'étude des résultats de KOULNEVITCH, consignés dans le tableau III que la teneur en peroxydes diminue très lentement. Comme l'a montré RODOPOULO (*op. cit.* (7-*b*) p. 219), les quinones sont réduites au cours de la fermentation alcoolique. Les essais comprenant les dosages des quinones, du glutation et la mesure du potentiel faisaient suite à ceux dont les résultats se trouvent consignés dans le tableau I. Effectivement, au début de la fermentation on observe la disparition des quinones sous l'action du glutathion contenu dans les levures introduites. Les quinones apparaissent de nouveau, après la fin de la fermentation, après le soutirage. Cette fois-ci, leur formation est due à l'action des sels des métaux lourds, en présence de l'oxygène de l'air et non à l'action de la polyphénoloxydase sur les polyphénols. Le tableau VI résume les données analytiques obtenues.

TABLEAU VI

Modification de la teneur en quinones, en glutathion oxydé et réduit et du potentiel oxydoréducteur au cours de la fermentation du moût de raisin.

Époque des déterminations	Quinones mg/litre	Glutathion mg/litre		Potentiel E_H mV	Couleur du jus
		Réduit	Oxydé		
Avant l'introduction des levures..............	10,2	0	0	475.3	Brun intense
Après l'introduction des levures	7,1	0	7,0	407,5	Brun
Après 3 heures...........	0	6,5	0,76	353,6	Jaune paille clair
Après 6 heures...........	0	7,1	0	215,1	

La glutathion fonctionne comme un transporteur d'hydrogène :



Le glutathion réduit également l'acide dehydroascorbique en acide ascorbique.

Le potentiel limite le plus bas observé est de + 135 *m*V ce que confirme *grosso modo* les résultats de JOSLYN et DUNN (*op. cit.* (14)). SCHANDERL (16) a observé à la fin de la fermentation le rH_2 égal à 13,2 ; en général, le rH_2 est compris entre 16,5 et 17.

PEYNAUD (17) a mesuré les potentiels-limites, au cours de ses essais de fermentation, compris entre les valeurs de + 70 *m*V et — 60 *m*V (en rH_2 — 9,5 et 4,2) ; disons tout de suite que la détermination colorimétrique du potentiel, utilisée par l'auteur, donne toujours des résultats très incertains. Les modes de la culture des levures influent sur le comportement ultérieur ; d'après SCHANDERL (*op. cit.* (16) p. 227), les levures cultivées en présence de l'air fermentent à un rH_2 supérieur. Faisant intervenir le pouvoir fermentatif des levures, ANTONIANI les classe suivant leurs potentiels-limites (18).

Parmi les facteurs oxydoréducteurs du milieu agissant au cours de la fermentation alcoolique du moût de raisin, l'oxygène joue son rôle particulier. Depuis, PASTEUR, le rôle de cet élément a été évoqué par différents chercheurs surtout au point de vue de l'accélération de la fermentation et de l'obtention des vins stables (*op. cit.* 9-*b*). D'ailleurs, comme nous l'avons vu, les procédés du traitement du raisin sont liés avec une aération plus ou moins grande du moût. RIBÉREAU-GAYON, PEYNAUD et Mlle LAFOURCADE (19) ont étudié l'influence de l'aération sur la multiplication des levures et la marche de la fermentation ; ils ont effectué des mesures du potentiel au cours de cette dernière. Au début de la multiplication des levures, soit pendant les deux premiers jours, le potentiel ne varie pas. En présence d'air, dans les 48 heures suivantes, le potentiel descend à + 110 — + 120 *m*V ; en anaérobie cette valeur est atteinte dans 11 jours et, pratiquement dans ce cas, le potentiel est de l'ordre de + 175 *m*V ; le potentiel remonte à partir du 11e jour, lorsqu'il reste 10 à 20 g de sucre à fermenter. Les auteurs concluent que le potentiel peut être indépendant de la multiplication des levures et de la vitesse de fermentation et que des mesures du potentiel indiquent la vitesse de la consommation de l'oxygène dissous.

Notons que les dosages des différentes formes de l'oxygène n'ont pas été effectués. Les données de RODOPOULO mentionnées plus haut comblent en partie cette lacune.

Les recherches de RIBÉREAU-GAYON, de PEYNAUD et de Mlle LAFOURCADE ont démontré que les levures trouvent en oxygène introduit, au plus tard, au deuxième jour de la fermentation un accélérateur pour leur multiplication et pour leur activité fermentaire.

Quant aux facteurs réducteurs, on connit le rôle de l'anhydride sulfureux ; par contre, l'emploi de l'acide ascorbique en œnologie est récent. En 1948 VETCHER et LOZA (20) ont étudié l'emploi des vitamines B_1 et C au cours de la champagnisation ; ils ont insisté sur l'utilité de l'addition d'acide ascorbique et même d'acide isoascorbique pour faciliter la maturation des vins en bouteille.

KOCH (21) a suivi les modifications du potentiel au cours de la fermentation ainsi qu'après sa fin, des moûts de MULLER-THURGAU et de RIESLING en fonction des additions d'anhydride sulfureux ou du chauffage du moût.

L'auteur emploie également la méthode I. T. T. (Indicator Time Test) selon GRAY et STONES, basée sur les propriétés des substances réductrices de décolorer une solution de 2-6 dichlorophénolindophénol. Comme on le sait, cette détermination concerne surtout les substances à lente vitesse d'oxydation; d'ailleurs, les substances, telles que la vitamine C, les réductones, les mélanoï-

dines, la cystéine, les sulfites, sont signalées comme réductrices de l'indicateur utilisé (*op. cit.* (9-*a*) p. 10-11).

D'après Koch l'utilisation de l'acide ascorbique, comme agent conservateur, contre l'oxydation non enzymatique dans les vins est intéressante au point de vue de l'amélioration de leurs qualités organoleptiques. Remarquons que l'auteur utilise, suivant l'habitude établie en Allemagne, seulement les valeurs du rH_2 ; il aurait intérêt de connaître aussi les données potentiométriques complètes : le potentiel, le pH des moûts et des vins.

Nous ne connaissons pas d'autres travaux concernant le potentiel au cours de la vinification en blanc. D'ailleurs, la vinification en rouge est encore moins étudiée au point de vue qui nous intéresse.

2° Vinification en rouge.

Joslyn et Dunn (*op. cit.* (14)) ont suivi les modifications du potentiel d'un jus de raisin rouge (pH initial 3,92, pH final — 3,5-3,8). Contrairement au moût de raisin blanc, le potentiel atteint la valeur en plus basse de + 60 *m*V plus lentement dans 40 heures.

L'étude expérimentale méthodique des facteurs intervenant dans la vinification en rouge, comprenant les mesures électrométriques du potentiel a été entreprise en 1952 par Ribéreau-Gayon et Ribéreau-Gayon junior (22).

Les cuves utilisées, de 600 litres de capacité, possèdent des tubulures pour le thermomètre, pour les deux électrodes de platine et un long pont de jonction avec l'électrode au calomel. Les deux conducteurs correspondant aux deux électrodes de platine forment un câble unique protégé par une gaine métallique mise à la masse. Il a été constaté que dans ces conditions 20 mètres de conducteurs ne modifient pas les résultats ce qui a permis d'avoir un potentiomètre fixe au cours de toutes les mesures.

L'étude des variations du potentiel au cours de la fermentation dans de différentes conditions, a montré que le potentiel limite est de l'ordre de 100 *m*V.

Le potentiel des moûts témoins descend vers la valeur limite de + 130 *m*V au bout de 3 jours. Pour le moût sulfité, on constate une baisse lente du potentiel au début et ensuite une courbe assez semblable à celles des moûts-témoins. La température de fermentation a une influence sur la variation du potentiel. Pour une température inférieure à + 20°C, le potentiel descend rapidement vers la valeur-limite et ensuite remonte à + 160 *m*V environ. La chute du potentiel est graduelle dans le cas des températures comprises entre + 25°-+ 30°C pour atteindre la limite de + 100 *m*V au bout de 4 jours ; ensuite, le potentiel reste sans changement.

Ces particularités s'expliqueraient par la formation plus grande de corps réducteurs ou de réducteurs plus énergiques. Il manque pour le moment, les moyens d'identifier et de doser ces corps réducteurs. Il est intéressant de noter que la présence de la rafle ne modifie pas sensiblement le potentiel. Par contre, Dourmischidzé (23) a établi que les parties solides de la vendange influent sur le potentiel. Dans les conditions de la cave expérimentale de l'Institut de Viticulture et d'Oenologie de Telavi, Georgie, S. S. S. R., le potentiel, au cours de la fermentation en absence de ces parties est de + 225*m*V en moyenne et de + 130-140 *m* en leur présence.

J. Ribéreau-Gayon et P. Ribéreau-Gayon admettent que le potentiel n'est pas un facteur simple de la marche de la fermentation, car il dépend de la composition du milieu, du mode d'obturation, de la température des aérations

passagères. S'il n'est pas une grandeur variant d'une manière simple avec les données de l'expérience, il peut néanmoins aider, comme le pH, à étudier les phénomènes observés.

Il est facile de constater que les recherches sur les modifications du potentiel au cours de la vinification sont encore rares et fragmentaires.

B. — ÉLABORATION DES VINS MOUSSEUX PAR FERMENTATION ALCOOLIQUE PRODUIT DANS LES VINS SECS ENRICHIS EN SUCRE.

L'élaboration des vins mousseux s'effectue suivant deux méthodes : avec ou sans addition de sucre. La méthode champenoise fait appel à un vin sec auquel on ajoute une liqueur de tirage, un levain préparé avec des levures et suivant la maison, des produits favorisant la fermentation. L'élaboration des vins mousseux sans addition de sucre suppose l'emploi de vins naturellement sucrés. Les travaux existants actuellement sur les modifications du potentiel concernent seulement les vins mousseux obtenus par la méthode champenoise en bouteilles ou en cuves closes. Toutes ces recherches ont été effectuées en Russie. Nous avons réussi à consulter la presque totalité des publications connues, sauf celles de PRIACHINA (24) tout au moins, telle est notre impression.

a) Détermination électrométrique du potentiel.

La détermination du potentiel dans les vins mousseux nécessite d'abord un appareillage spécial pour prélever les prises d'essais sans perturbation de l'équilibre gazeux ; ensuite le dispositif, dans lequel les mesures potentiométriques sont effectuées, doit supporter des pressions d'ordre de 5-7 atmosphères. ADJEMIAN (25) a mis au point un tel ensemble de dispositifs. Les essais, effectués sur différents vins, en absence ou en présence du gaz carbonique, en commençant par une simple solution de ce gaz et en terminant par la pression de 1,5 atm. dans le cas des expériences relatives au pH et par la pression de 5 atm. pour le potentiel, ont démontré l'absence de toute influence de ce gaz sur ces deux indices. Dans ces conditions il n'existe aucune nécessité d'employer des dispositifs spéciaux pour mesurer le potentiel dans les vins mousseux ; il suffit de dégager lentement et partiellement ces vins avant leur introduction dans un dispositif habituel de mesure du potentiel.

b) Fabrication en bouteilles.

1° Évolution du potentiel.

RODOPOULO (26) a publié en 1944 les résultats de ses recherches, poursuivies pendant la période 1937 à 1942, sur les modifications du potentiel dans es vins mousseux élaborés en bouteilles. Il a constaté d'abord, que le potentiel des vins, conservés dans les fûts avant le tirage, diminue au cours de leur maturation atteignant, par exemple, + 260,5 *m*V.

Au cours de la prise de mousse en bouteilles la baisse du potentiel est considérable ; les valeurs observées variaient entre + 217 et + 133 *m*V ; pour les bouteilles normalement bouchées cette valeur est de + 150 *m*V. Lors de l'opération de dégorgeage le vin absorbe de l'oxygène et son potentiel augmente. C'est ainsi que pour le vin du tirage de l'année de 1939 le potentiel a remonté de

$+ 153{,}8\ mV$ à $+ 331{,}2\ mV$. Après le dégorgeage le potentiel baisse de nouveau et au bout de quelques années atteint $+ 217 — + 222\ mV$. Les recherches systématiques d'ADJEMIAN (27) ont donné des résultats plus cohérents ; par contre, la durée des expériences n'a pas été longue. La prise en mousse s'effectuait à la température de $+ 13 — + 20$°C pendant 2 mois environ. Les mesures du potentiel en fonction de l'augmentation de la pression et ensuite des opérations telles que le remuage et le dégorgeage, ont précisé clairement la baisse continuelle du potentiel. D'autre part, les essais spéciaux ont de nouveau ressorti l'indépendance du potentiel vis-à-vis du gaz carbonique et de la grandeur de sa pression.

Le tableau VII illustre l'évolution du potentiel au cours de la fermentation complémentaire des vins blancs et d'un vin rouge en bouteille.

TABLEAU VII

Vins	E_H des vins avant la prise de mousse mV	Potentiel E_H mV a la pression en atmosphères						
		1 At	2 At	3 At	4 At	5 At	Après le remuage 5,5 At	Après le dégorgeage 4 At
Vin blanc Lalvari...	409	376	366	338	316	292	288	280
« « Rkatziteli.	398	379	350	332	309	282	275	273
« « Mschateli .	380	372	351	323	305	287	273	270
« « Vaskeat ..	406	380	336	316	307	291	273	260
« rouge Areni	386	376	335	314	300	282	278	274

La détermination de différents indices analytiques dans les vins expérimentés a permis de mettre en évidence la diminution de l'acétaldéhyde, du fer et du cuivre et l'augmentation des esters et des acétals ; la quantité de l'oxygène dissous devient extrêmement petite.

Nous avons extrait du tableau n° 3 donné dans la publication d'ADJEMIAN les résultats des dosages chimiques les plus intéressants pour les réunir dans le tableau VIII.

Il est regrettable que les indications du pH manquent. A juger d'après les indications données dans la première publication d'ADJEMIAN (*op. cit.* (25)), ces pH sont de l'ordre de 3,4-3,5.

2° Régime oxydoréducteur et potentiel.

La fabrication des champagnes, la champagnisation, procède en deux étapes essentielles à savoir :

— la vinification proprement dite,

— la prise de mousse ou la fermentation complémentaire destinée à développer, en bouteilles, l'excès de gaz nécessaire à la mousse.

Les Œnologues soviétiques réservent le terme « Champagnisation » à la fermentation complémentaire en bouteilles ou en cuves closes.

Les vins destinés à la fermentation complémentaire ne doivent pas être oxydés ; leur conservation et la maturation exigent un niveau suffisamment bas du potentiel.

D'autre part, l'admission de l'oxygène au cours des opérations, effectuées avant ou après la fermentation complémentaire, a fait l'objet, en raison de son importance, de recherches spéciales comprenant également l'étude des

effets de sulfitation modérée. En outre, nous signalerons les résultats obtenus au cours de recherches sur la régulation du régime oxydoréducteur de la champagnisation.

Tableau VIII

Indices analytiques en mg/litre	Lalvari			Rkatziteli		
	Avant la ferm.	Après la ferm.	Mousseux sec prêt	Avant la ferm.	Après la ferm.	Mousseux sec prêt
Aldehydes	6,5	8,14	4,34	6,9	12,14	4,0
Acetals	11,62	14,98	14,0	10,5	16,3	16,2
Esters totaux	308	324	485	262	383	406
Fer	15,0	14,1	8,46	13,0	12,0	11,4
Cuivre	1,9	1,4	1,2	1,9	1,3	1,35
Oxygène	3,5	2,8	1,0	3,7	2,75	0,8

Indices analytiques en mg/litre	Mschali			Voskeat			Areni		
	Avant la ferm.	Après la ferm.	Mousseux sec prêt	Avant la ferm.	Après la ferm.	Mousseux sec prêt	Avant la ferm.	Après la ferm.	Mousseux sec prêt
Aldehydes	4,0	7,87	4,74	4,74	6.06	4,7	4,2	8,29	5,5
Acetals	12,7	15,0	15,35	11,62	12,8	13,0	9,3	18,6	17,4
Ester totaux	414	506	556	405	418	425	265	566	506
Fer	13,6	11,3	8,4	14,8	13,1	5,6	17,6	15,5	14,6
Cuivre	0,5	0,4	0,4	2,5	2,1	2,0	0,4	0,24	0,23
Oxygène	2,84	2,0	traces	4,6	2,1	traces	—	—	—

α) Ses facteurs.

1° *Oxygène.*

Rodopoulo (*op. cit.* (26-*a*)) a étudié les modifications du potentiel en fonction des quantités d'oxygène dissous au cours de la champagnisation. L'enrichissement du vin en oxygène s'effectue surtout au moment de la préparation du tirage ; après le dégorgeage le vin ne contient pas de l'oxygène. Pour Rodopoulo, le potentiel dépend de la teneur du vin en oxygène ; d'autre part, le potentiel du vin privé d'oxygène est de + 336 *m*V. Par agitation pendant 30 secondes, le potentiel de ce vin augmente jusqu'à + 405 *m*V corrélativement à l'augmentation de la quantité d'oxygène dissous à 4,1-4, 2 ml par litre.

L'addition du fer, du cuivre sous forme de sulfates ferreux et cuivrique n'augmente pas le potentiel du vin, soit au cours de la fermentation, soit après le dégorgeage en raison de l'existence des réactions de réduction dans le vin. Il est très intéressant de connaître le bilan des formes de l'oxygène (oxygène moléculaire dissous, oxygène actif) dans les vins mousseux.

Les données de Koulnevitch (*op. cit.* (10)), concernant les formes de l'oxygène dans les vins, avant la fermentation complémentaire ainsi que dans les vins mousseux terminés, sont extrêmement instructives. Entre autres, elles démontrent que le potentiel de tels vins, privés de l'oxygène, est de + 240-250 *m*V.

Nous avons reproduit ces données dans le tableau IX.

On constate la diminution de l'indice des peroxydes et du potentiel en

fonction du temps. Le vin mousseux de 1952 présente une exception, tout simplement en raison de l'introduction de la liqueur d'expédition 15 jours avant l'analyse.

TABLEAU IX

Vin	Oxygène mg/litre			Potentiel E_H *mV*
	Oxygène total	Indice des Peroxydes	Oxygène dissous	
Vin destiné à la prise de mousse:				
Conservé en bouteilles 1 mois	0,60	0,20	0,40	290
« « « 2 ans	0,09	0,09	0,00	250
« « « 2,5 ans	0,00	0,00	0,00	246
Champagne soviétique:				
Demi-doux, dégorgeage 1952	0,70	0,40	0,30	270
demi-sec, « 1951	0,10	0,10	0,00	250
demi-doux, « 1950	0,00	0,00	0,00	232
demi-doux, « 1949	0,00	0,00	0,00	240

2° *Anhydride sulfureux.*

L'influence de l'anhydride sulfureux, introduit dans le vin de tirage, sur le déroulement de la fermentation en bouteilles est, en général, considéré comme négative en raison de son action perturbatrice sur les levures et de sa réduction possible en l'hydrogène sulfuré. Or, comme on le sait, l'anhydride sulfureux favorise la fermentation régulière, la meilleure utilisation du sucre, l'augmentation des teneurs en glycérol et l'amélioration du bouquet. Ces bienfaits de l'anhydride ont amené FROLOV-BAGREEV, AGAPOV et KALININA (28) à étudier ses effets au cours de la fermentation complémentaire et à déterminer, le cas échéant, l'optimum de sa concentration dans le vin de tirage compatible avec les qualités organoleptiques des vins mousseux. Les teneurs expérimentées s'échelonnaient entre 10 mg et 80 mg par litre. Les essais effectués ont mis en évidence, qu'à partir de 30 mg par litre, les propriétés organoleptiques des vins obtenus accusent une nette régression au point de vue du goût. En outre, la combinaison de l'anhydride devient plus lente et la durée de la fermentation augmente en fonction des doses d'anhydride croissantes. Pratiquement, la dose de 20 mg par litre doit être considérée comme optimum, compte tenu des résultats de l'examen organoleptique. La formation hydrogène sulfuré n'a pas été constatée ; ce dernier apparaît plutôt à la suite de la réduction du soufre, accidentellement présent dans la vaisselle vinaire.

Quant aux variations du potentiel à la fin de fermentation en fonction des teneurs d'anhydride, elles n'ont pas été sensibles, comme, d'ailleurs, les variations du pH ce que démontrent quelques chiffres limites :

	pH	E_H mV
Vin initial	3,1	387
Vins de tirage	3,04-2,9	411-439
A la fin de fermentation	3,09-3,0	293-306

β) SA RÉGULATION

Les propriétés organoleptiques des vins mousseux dépendent non seulement des sortes de raisin et des particularités des procédés technologiques,

mais aussi des processus biochimiques s'effectuant dans tous les stades de la fabrication en commençant par le pressurage du raisin et en finissant par la champagnisation.

Les méthodes de régulation des phénomènes oxydoréducteurs au cours de la fabrication des vins mousseux sont basées sur le contrôle de l'admission de l'oxygène de l'air et sur la sulfitation du moût avant la vinification et du vin destiné à la champagnisation avant son tirage.

Les recherches de RODOPOULO, effectuées à l'échelle industrielle, constituent une contribution très importante à l'amélioration de la qualité des vins mousseux, tout au moins, en Russie (*op. cit.* (7-*c*)).

La champagnisation comprenait deux séries d'essais éxécutés suivant le schéma technologique habituel et suivant le procédé mis au point par RODOPOULO et OCHREMENKO ; chaque essais portait sur 400 Hl. Le procédé habituel n'employait que le soufrage de la vaisselle vinaire, tandis que le procédé nouveau avait recours à la sulfitation : le moût recevait 100-105 mg d'anhydride par litre et on laissait le vin sur les levures pendant 60 jours ; enfin, au cours de l'assemblage la sulfitation était de l'ordre de 25 mg par litre. Après l'assemblage, la moitié du vin de chaque essai était transvasée à l'abri de l'air sous la protection du gaz carbonique, l'autre à la manière habituelle en présence d'air. L'expérience s'effectuait ensuite suivant quatre variantes :

I. — Procédé habituel.
II. — Procédé habituel, à l'abri de l'air en présence du gaz carbonique.
III. — Procédé nouveau sans l'emploi du gaz carbonique.
IV. — Procédé nouveau, en présence de gaz carbonique.

Les variantes II et IV comprenaient la désaération de la vaiselle vinaire à l'aide du gaz carbonique.

Après l'assemblage les vins des variantes I et III contenaient 7,6 mg d'oxygène par litre tandis que les vins des variantes II et IV seulement 1,8-2,1 mg.

Après le coupage suivi d'un collage au ferrocyanure, il y avait une nouvelle absorption de l'oxygène.

Le tableau X (correspondant au tableau III de la publication de RODOPOULO) montre les modifications des teneurs en oxygène et du potentiel.

TABLEAU X

Variantes	Avant le coupage		Après le coupage et le collage bleu		Après le repos de 20 jours	
	Potentiel E_H *m*V	Oxygène ml/litre	Potentiel E_H *m*V	Oxygène ml/litre	Potentiel E_H *m*V	Oxygène ml/litre
I.— Habituel en présence d'air	325,6	1,8	405,6	6,8	315,9	0,0
II.— Habituel à l'abri de l'air	305,7	0,7	314,7	0,8	300,8	0,0
III.— Procédé nouveau présence d'air	318,9	1,6	387,9	6,2	310,7	0,0
IV.— Procédé nouveau à l'abri de l'air	302,8	0,5	305,3	0,6	295,8	0,0

On remarque une rapide disparition de l'oxygène après le collage au ferrocyanure ce qui s'explique, d'après RODOPOULO, par l'action des complexes du fer et de l'acide tartrique, possédant des propriétés catalytiques.

Le soutirage donnait lieu à un nouvel enrichissement en oxygène dans les mêmes proportions qu'après le coupage. Les vins ont été conservés dans les fûts pendant 5 mois : les variantes I et III avec l'ouillage et les variantes II et IV également, mais seulement pendant 2 mois, ensuite la conservation se faisait avec la bonde de côté.

Après ce délai la champagnisation en bouteilles s'effectuait pour les variantes I et III suivant le procédé technologique en vigueur à l'usine et pour les variantes II et IV à l'abri de l'air, sous la protection du gaz carbonique pour toutes les opérations : introduction de la liqueur de tirage, brassage compris ; d'ailleurs, les bouteilles étaient également désaérées.

Les données analytiques concernant les quantités d'oxygène absorbé, les modifications du potentiel au cours de l'opération du tirage, de la fermentation, du séjour en cave, après dégorgeage sont réunies dans le tableau XI, correspondant au tableau IV de la publication de RODOPOULO. Nous y avons ajouté les résultats de l'examen organoleptique indiqués par l'auteur à part.

Il ressort de l'examen de ces résultats que tout le long de la fermentation le potentiel baisse et la teneur en oxygène tend vers zéro. Si le dégorgeage s'effectue rapidement et si la liqueur d'expédition ne contient pas d'oxygène, comme c'est le cas pour les variantes II et IV, la hausse du potentiel est comparativement moindre.

Quoiqu'une seule sulfitation, sans emploi du gaz carbonique (variante III), produise un bon mousseux, la régulation d'admission de l'oxygène est beaucoup plus effective sur l'amélioration des qualités organoleptiques du vin.

Remarquons que la quantité d'oxygène de l'ordre de 0,9-1,12 ml par litre, contenue dans le vin de tirage, est suffisante pour le multiplication des levures et pour la fermentation du sucre.

Les recherches de RODOPOULO ont démontré que la régulation du régime oxygéné du moût et du vin au cours de la champagnisation joue un grand rôle dans l'amélioration des qualités des vins mousseux. L'auteur met l'accent sur l'importance de la sulfitation du moût et du séjour du vin sur les levures ; cette dernière opération assure au vin, d'une part, l'enrichissement en aminoacides, source des substances aromatiques, et, d'autre part, l'assouplissement de l'acidité par transformation de l'acide malique en acide citrique.

Rappelons que nous avons exposé précédemment les résultats obtenus par RODOPOULO concernant le comportement des moûts sulfités et non sulfités et le déroulement de leur fermentation (voir les tableaux IV et V).

c) **Fabrication en cuves closes.**

La préparation des vins mousseux en bouteilles, d'après la méthode champenoise, est dispendieuse. Elle réclame des soins minutieux, comporte des pertes par casse non négligeables ; elle est lente car, dès le tirage, l'œnotechnicien n'est plus maître des fermentations.

Ces inconvénients économiques ont déterminé la mise au point d'une méthode de fabrication en cuve close faisant office de bouteille gigantesque, sans s'écarter du principe de la double fermentation. L'idée d'un tel réservoir a été émise par MAUMENÉ en 1859.

1° **Etat actuel du procédé.**

Comme le remarque AGABALIANTZ (29), la technologie de la fabrication en cuves closes n'est pas encore complètement établie ; d'ailleurs, d'une façon

TABLEAU XI

Températures comprises entre 15,2 et 16,2.

Variante, époque des déterminations	Potentiel E_H *mV*	Oxygène ml/litre	Pression atm.	Dégustation	
				Note	Observations
I. — *Procédé habituel*					
Avant la fermentation	417,5	8,1	0,0		
Fermentation :					
Après 10 jours	368,6	3,7	1,8		
— 20 —	355,8	1,5	3,5		
— 30 —	325,6	0,2	4,9		
— 50 —	302,7	0,0	5,0		
— 1 an	252,7	0,0	4,9		
— 2 ans	247,8	0,0	4,9		
— dégorgeage	335,8	1,3	3,0	8,0	Goût dur, bouquet peu formé.
II. — *Procédé habituel à l'abri de l'air*					
Avant la fermentation	348,0	1,2	0,0		
Fermentation :					
Après 10 jours	335,6	0,2	1,7		
— 20 —	328,7	0,0	3,3		
— 30 —	313,3	0,0	4,8		
— 50 —	282,5	0,0	5,0		
— 1 an	245,0	0,0	4,9		
— 2 ans	230,0	0,0	4,9		
— dégorgeage	305,0	0,0	3,0	8,8	Goût frais, bouquet fin, bien formé.
III. — *Procédé nouveau*					
Avant la fermentation	409,6	8,0	0,0		
Fermentation :					
Après 10 jours	360,8	3,8	1,9		
— 20 —	354,6	1,8	3,6		
— 30 —	333,8	0,1	5,1		
— 50 —	305,9	0,0	5,0		
— 1 an	257,6	0,0	5,0		
— 2 ans	241,6	0,0	5,0		
— dégorgeage	350,7	1,2	3,1	8,7	Goût frais, bouquet fin, moins bien formé.
IV. — *Procédé nouveau à l'abri de l'air*					
Avant la fermentation	345,6	1,1	0,0		
Fermentation :					
Après 10 jours	331,6	0,3	1,6		
— 20 —	323,6	0,0	3,4		
— 30 —	310,7	0,0	4,8		
— 50 —	280,5	0,0	5,0		
— 1 an	231,6	0,0	4,9		
— 2 ans	222,6	0,0	4,9		
— dégorgeage	308	0,0	3,0	8,9	Goût frais, bouquet fin bien formé.

générale, la qualité des vins mousseux, obtenus par ce procédé, est inférieure à celle des vins préparés en bouteilles. En effet, la fabrication en cuves closes ne comporte pas un long contact du vin avec le dépôt des levures ; d'autre part, elle ne permet pas toujours d'éviter la déchampagnisation des vins mousseux et l'augmentation du potentiel oxydoréducteur ce qui se répercute sur leurs qualités.

DRBOGLAV (20) a montré les défauts de la champagnisation suivant le procédé de Chaussepied ; la présence de l'oxygène détermine l'avilissement de la qualité du vin, augmente la teneur en aldéhydes et modifie la couleur du vin.

C'est ainsi qu'à la fin de la fermentation la teneur en oxygène est de 0,4-0,8 ml par litre et le potentiel atteint la valeur de 320-330 *m*V. Au cours du remplissage des bouteilles ce potentiel est élevé : 410 *m*V ; en outre le vin contient 4,1 ml d'oxygène par litre. De sorte que les vins deviennent trop oxydés et ceci malgré la chute du potentiel, au bout de 10-12 mois de conservation, à 220-270 *m*V.

Nous voyons que les valeurs basses du potentiel ne correspondent pas toujours au maximum des qualités organoleptiques des vins.

2° Régulation du régime oxydo-réducteur.

Comme nous l'avons déjà vu, l'influence de l'oxygène sur les qualités des vins mousseux est souvent négative. La régulation de son admission constitue un problème très important ; déjà au point de vue technique, cette régulation est difficile à obtenir. L'emploi de l'anhydride sulfureux donne des moyens de diriger les processus oxydoréducteurs au cours de la champagnisation. Tout récemment, l'acide ascorbique a été proposé comme régulateur de ces processus.

Nous allons exposer brièvement dans ce qui suit l'essentiel des recherches concernant l'utilisation de tous ces procédés de la régulation du régime oxydo-réducteur au cours de la fabrication des vins mousseux en cuves closes.

a) Limitation d'accès de l'oxygène et sulfitation

Les résultats des recherches de Rodopoulo sur l'amélioration de la technologie de fabrication des vins mousseux en cuves closes ont été publiés en 1950 (31) ; le travail sur la fabrication de ces vins en bouteilles est paru plus tard, en 1952 ; nous connaissons déjà ses conclusions (*op. cit.* (7-*c*)). Le mémoire de 1950 compare à l'échelle industrielle, d'une part, le procédé habituellement utilisé à l'usine uniquement avec le soufrage de la vaisselle vinaire, et, d'autre part, le procédé faisant appel à la sulfitation ; dans ces deux cas un lot de vin a été manipulé en présence de l'air et un autre sous protection du gaz carbonique. Finalement, comme c'était le cas pour les vins fabriqués en bouteilles, on cherchait à comparer les quatre variantes ; également on a employé pour chaque procédé 400 Hl de vin. Le procédé à sulfitation comportait l'addition de 100-105 mg d'anhydride par litre avant la fermentation du moût, ensuite une nouvelle addition au vin jusqu'à 200 mg par litre suivie d'un séjour sur les levures pendant 45 jours.

Les vins, obtenus en présence d'anhydride sulfureux, contenaient moins d'alcool (10°2 au lieu de 11°3 pour le contrôle) et une teneur plus grande en glycérol (7,0-7,3 g par litre au lieu de 6,0-6,2 pour le contrôle).

Nous ne citerons pas les données comparatives obtenues concernant les modifications du potentiel et les variations de la teneur en oxygène dissous au cours des différentes manipulations. Le procédé habituel du traitement du moût et les soutirages en présence de l'air permettent l'absorption jusqu'à 30 ml d'oxygène par litre, tandis que le procédé employant du gaz carbonique et travaillant, par conséquent, à l'abri de l'air, limite cette absorption jusqu'à 15 ml.

Le tableau XII, correspondant *grosso modo* au tableau II de la publication de Rodopoulo, nous montre les variations du potentiel au cours de la fermentation complémentaire en cuves closes, pendant et après le remplissage des bouteilles.

Il ressort de l'examen des résultats de ce tableau que la sulfitation seule

n'assure pas contre l'oxydation du vin ; la régulation d'admission de l'oxygène à l'aide du gaz carbonique produit des vins supérieurs aux précédents. La combinaison des deux modes permet d'obtenir des vins possédant des qualités organoleptiques intéressantes, mais inférieures à celles des vins fabriqués en bouteilles (voir le tableau XI). Bien entendu, le premier procédé de RODOPOULO utilise trop d'anhydride sulfureux ; nous avons déjà vu les changements apporté par cet œnologue dans son travail paru en 1952 (*op. cit.* (7-*c*)). RODOPOULO

TABLEAU XII

Le pH des vins — 3,2.

Variante, époque des déterminations	Potentiel E_H *m*V	Oxygène ml/litre	Pression atm.	Dégustation sur 10	Température du vin
I. — *Procédé habituel,* en présence de l'air :					
1° Avant la fermentation	425,6	8,2	0		17,5
Après le début de fermentation :					
2° — 10 jours...............	377,5	4,0	2,3		17,7
3° — 20 jours...............	362,8	0,5	4,5		17,7
4° Au cours du remplissage des bouteilles	390,5	3,6	2,5		— 3,0
5° Dans un mois après le remplissage	340,5	0,3	3,0	7,5	13,5
II. — *Procédé habituel,* chargement en présence de l'air. Traitement à l'abri de l'air :					
1° Mêmes opérations que pour le n° 1	355,6	1,5	0		17,5
2° *Idem*	340,6	0,0	2,2		17,7
3° *Idem*	332,6	0,0	4,5		»
4° *Idem*	343,7	traces	2,5		— 3
5° *Idem*	328,7	0,0	3,0	8,2	13,5
III. — *Procédé à sulfitation,* chargement, traitement en présence de l'air :					
1° Mêmes opérations que pour le n° 1	411,5	7,9	0		17,5
2° *Idem*	380,5	3,8	2,3		17,7
3° *Idem*	368,7	0,5	4,6		»
4° *Idem*	385,8	3,2	2,5		— 3
5° *Idem*	342	0,2	3,0	7,6	13,5
IV. — *Procédé à sulfitation complètement à l'abri de l'air* :					
1° Mêmes opérations que pour le n° 1	352,6	1,3	0		17,5
2° *Idem*	339,8	0	2,1		17,7
3° *Idem*	326,5	0	4,5		17,7
4° *Idem*	345,6	0	2,5		— 3
5° *Idem*	322,6	0	3,6	8,5	13,5

explique l'action néfaste de grandes quantités d'oxygène par l'oxydation de l'acide tartrique, en présence des sels de métaux lourds, en particulier, au cours du collage au ferrocyanure, avec la formation d'acides mesoxalique, glyoxylique et finalement de l'acide oxalique qui donne aux vins une certaine dureté. Par contre, en présence de petites quantités d'oxygène, il se forme de l'acide dicétosuccinique qui, dans des conditions anaérobies, agit sur l'acide tartrique et donne naissance à l'acide déhydroxymaléique ; ce dernier, par sa présence ou par son action sur d'autres substances, améliore les qualités organoleptiques du vin. Nous connaissons déjà toutes ces réactions exposées dans notre mise au point (32).

β) Emploi de l'acide ascorbique

L'effet positif de l'acide ascorbique sur les propriétés organoleptiques des vins mousseux a été déjà signalé par Vetcher et Loza (*op. cit.* (20)). Son emploi pour la fabrication de ces vins en cuves closes est encore plus intéressant au point de vue de la diminution du potentiel, comme l'ont démontré les recherches de Vetcher et Loza (33).

Les essais comparatifs ont été effectués dans les réservoirs de deux capacités ; les grands réservoirs étaient destinés pour la fabrication du vin mousseux demi-doux et les petits pour la fabrication du vin demi-sec. Le vin de tirage recevait 100 mg d'acide ascorbique par litre.

Le tableau XIII, correspondant au tableau I de la publication de Vetcher et Loza, résume les résultats obtenus.

Ces résultats démontrent que l'acide ascorbique diminue le potentiel très sensiblement non seulement au cours de la champagnisation, mais aussi pendant la conservation du vin. Par contre, les variations du pH sont insignifiantes. Les essais n'ont pas pu mettre en évidence une relation bien déterminée entre le potentiel et les teneurs en acétaldéhyde, en acétal et en esters neutres. La dégustation des vins, effectuée au moment du remplissage des bouteilles, a

Tableau XIII

Dates des déterminations	Potentiel E_H mV	
	Après l'addition de l'acide ascorbique	Réservoir de contrôle
Petits réservoirs : (le potentiel du vin du coupage en date du 8-12-53 — 365 mV)		
1953		
10-12	319	372
12-12	259	276
1954		
11-1 — Après le remplissage des bouteilles	392	337
31-5 — Après la conservation	278	365
Grands reservoirs (le potentiel du vin du coupage en date du 9-12-53 — 285 mV)		
1953		
12-12	197 (1)	
1954		
9-1 Après le remplissage des bouteilles	181 (1)	—
12-1 Avant le remplissage des bouteilles	—	287
26-1 Après le remplissage des bouteilles	—	317
1-6 (Après conservation)	252	317

(1) Les causes d'une telle chute ne sont pas connues

reconnu la supériorité des vins obtenus en présence d'acide ascorbique ce qui souligne l'importance de la valeur basse du potentiel au cours de la champagnisation ; la meilleure qualité des vins en dépend. Vetcher et Losa ont également étudié l'influence de l'acide ascorbique sur le potentiel et les propriétés organoleptiques au cours de la maturation des vins mousseux dans les bouteilles. Lors de ces essais, le remplissage des bouteilles s'exécutait suivant les différentes manières en présence de l'air, à l'abri de l'air avec l'emploi du gaz carbonique, avec l'addition de l'anhydride sulfureux ou de l'acide ascorbique.

Au bout de 10 mois, le potentiel était uniforme dans toutes les bouteilles ($E_H = 225$ *m*V), sauf dans les bouteilles remplies avec du gaz carbonique en raison de la présence probable de l'oxygène comme impureté. Par contre, la différence entre le goût de ces vins a été nette. Cette constatation démontre tout simplement que la valeur basse du potentiel dans les vins conservés longtemps ne peut servir comme indice de leur qualité. Cette qualité peut être obtenue et conservée par la suite à la seule condition de maintenir le potentiel au niveau suffisamment bas au cours de la champagnisation et de la maturation des vins. L'acide ascorbique utilisé pendant ces stades favorise l'amélioration des qualités des vins ce que démontrent les résultats de l'examen organoleptique toujours supérieurs par rapport aux vins de contrôle. Si l'acide ascorbique influe favorablement sur le goût et le bouquet des vins, il est sans action sensible sur leur couleur. Enfin cet acide se conserve assez bien dans les vins : au bout de 10 mois il en restait 60 mg environ par litre au lieu de 100 mg ajoutés au moment du remplissage des bouteilles.

D'après Vetcher et Loza, la régulation du potentiel peut être facilement obtenue à l'aide de l'acide ascorbique agissant sur le potentiel du vin même en présence de l'acide sulfureux.

Il nous reste à ajouter que le travail de Krassinsky et Priachina (34) traite également l'amélioration des vins mousseux fabriqués en cuves closes, à juger d'après la remarque de Saénko (35). Malheureusement, nous n'avons pas pu consulter l'original de la publication de ces deux œnologues. Toutefois, l'essentiel de leurs conclusions se trouve déjà précisé dans le paragraphe tout à l'heure indiqué.

γ) Élaboration des vins oxydés

Le terme « vins oxydés » désigne deux groupes de vins : vins très oxydés et vins oxydés. Ils se distinguent en premier lieu par leurs modes d'élaboration. Les vins très oxydés ou les vins du type Jérez, sont obtenus par la jérézation, effectuée dans les vins par des levures au stade oxydatif. Par contre, pour les vins du type Madère, appartenant au groupe des vins oxydés, l'œnotechnologie ne connaît pas de procédé fermentatif comparable à la jérezation. La madérisation des vins par la voie enzymatique naturelle à partir du raisin riche en enzymes oxydants n'est pas suffisante pour donner naissance aux véritables vins oxydés. Dans ces conditions l'accélération intensive des processus oxydatifs s'obtient par le traitement thermique spécial connu sous le nom de « madérisation ».

a) **Par les levures au stade oxydatif.**

La formation des vins du type Jérez est due à l'activité des levures formant un voile sur la surface d'un vin de type déterminé. Actuellement, on sait que les levures de Jérez sont les levures du genre Saccharomyces se trouvant au stade oxydatif de leur cycle d'évolution. Il existe une bibliographie considérable concernant les levures et les vins du type Jérez ; nous en avons donné un aperçu succinct dans une publication précédente (36).

1° *Modification du potentiel au cours de la jérézation.*

En 1948 Mme Saénko (*op. cit.* (35)) a publié les résultats de ses études sur les modifications du potentiel oxydoréducteur et sur celles de la composition

chimique des vins soumis à l'action des levures de Jérez. Ces recherches ont grand intérêt en raison du manque de données concernant l'évolution du potentiel durant ce processus fermentatif.

En 1953, nous avons exposé brièvement les résultats de ces recherches (*op. cit.* (9-*a*)). Antérieurement, cet auteur a établi que pour le développement du voile de Jérez et pour la formation des caractères de ce vin la température, la concentration d'alcool, de sucre, le plâtrage et l'aération jouent un rôle essentiel (37).

Les mesures du potentiel, effectués par SAÉNKO, se faisaient suivant deux méthodes : périodiquement, sur les prises d'essai dans une cellule à électrodes, ou en continu, avec les électrodes disposées à demeure dans des récipients.

Lors de la formation progressive du voile des levures de Jérez, la teneur en oxygène dissous dans le vin diminue pour devenir nulle, tandis que le potentiel accuse au bout de 65 jours une chute de 480 *m*V à 264 *m*V. Cette diminution est liée, d'une part, à la prolifération des levures sur la surface du vin, accompagnée d'une absorption d'oxygène de l'air et, d'autre part, à l'accumulation des produits de l'activité des levures et aux processus s'effectuant dans le vin grâce aux substances de l'autolyse des levures dans le voile et dans leur dépôt.

Le renouvellement du vin sous le voile, faisant partie de la technologie du vin du type de Jérez, ne détermine pas le maintient du potentiel au niveau atteint en raison de l'accès libre de l'oxygène, le voile étant partiellement détruit ; dans ce cas, la jérézation a lieu à un potentiel plus élevé. Cette circonstante démontre que le processus fermentatif n'est pas lié à une valeur quelconque du potentiel et peut se produire indifféremment à ses différents niveaux ; le voile joue le rôle de régulateur des réactions oxydoréductrices.

Le tableau XIV reproduit les données consignées dans le tableau I de la publication de SAÉNKO. Nous avons éliminé les résultats concernant le rH_2, l'oxygène dissous qui disparaît dans le vin des le début du traitement, le pH qui varie peu, de 3,19 à 3,25.

Signalons tout de suite que dans les essais, où le potentiel était mesuré par la méthode continue, sa variation était, au bout de 30 jours très sensible, de 520 *m*V à 188 *m*V.

Il ressort des résultats obtenus par SAÉNKO que les variations du pH pendant la jérezation sont insignifiantes ; par contre, la diminution des quantités d'acides volatils et non volatils est liée à ses valeurs : au-dessous du pH3 cette regression ne s'observe pas. Les composants du bouquet des vins de Jérez-l'aldéhyde, les acétals et les esters volatils — augmentent.

D'après SISSAKIAN, POPOVA, EGOROV et POUTCHKOVA (38), le goût du vin de Jérez est déterminé non pas par la teneur en aldéhyde, mais par le rapport $\frac{\text{acétaldéhyde.}}{\text{acétals}}$ Les essais de SAÉNKO (39) montrent que le rapport est de l'ordre de 2,0-2,35 dans le cas des vins harmonieux et typiques.

2° *Influence des différents facteurs.*

SAÉNKO (*op. cit.* (35)) a également étudié les modifications du potentiel sous l'action de différents réducteurs — hydrosulfite, acétaldéhyde, acide formique — introduits sous le voile jeune au début de la jérezation.

Au bout d'un nombre d'heures variable pour chaque substance introduite, le potentiel reprenait sa valeur initiale ; en outre, le processus de jérezation, les

TABLEAU XIV

Durée en jours	Aspect du voile	E_H *mV*	Acidité titr. $^0/_{00}$	Acides vol. $^0/_{90}$	Acétal-déhyde mg litre	Acétal mg/litre	Esters vol. g/litre	Sucre %	Alcool % vol.	Dégustation
1	Introduction du voile.	480	5,61	1,11	33,5	16,5	traces	0,24	15,0	Vin jeune, bon goût et bouquet.
3	Petites colonies.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	Voile mince, par colonies	424	5,61	1,10	63,45	17,4	traces	0,20	14,8	Pas de changement.
19	Voile continu, mince.	381	5,61	1,10	135,3	18,8	—	—	14,6	Changements insignifiants dans le goût et le bouquet.
33	Voile épais, à plis.	310	5,61	0,51	245,76	113,63	—	—	14,3	Goût, bouquet net de Jérez.
50	Voile très épais, plissé, une partie en dépôt.	292	4,75	0,39	338,97	153,40	0,4294	0,19	13,8	*Idem*
65	Voile, épaisseur 1 cm ; dépôt.	264	4,18	0,27	364,2	181,7	0,4329	0,18	13,6	*Idem*
66	Introduction du vin sous le voile.									
67	Une grande partie du voile dans le dépôt, voile de 0,7 cm d'épaisseur.	375,3	4,59	0,43	257,4	119,18	0,148	—	14,8	Goût, bouquet très net de Jérez.
90	Voile gris foncé, dépôt dans le fond.	349,8	4,08	0,37	682,0	157,8	—	—	—	*Idem*
125	Voile gris foncé, dépôt dans le fond.	438	2,55	0,26	740,52	175,82	—	—	13,4	Goût, bouquet forts de Jérez.

caractères du vin n'ont pas été influencés par tous ces traitements. La jérezation n'étant pas liée au potentiel du milieu, il n'existe dans ces conditions aucune nécessité de le diminuer artificiellement.

Par contre, l'influence des métaux lourds, fer et cuivre, sur la jérezation est positive, comme l'ont démontré SAPONDJIAN et GUEVORKIAN (40). Lors de leurs essais, le vin expérimenté recevait, avant l'introduction des levures de Jérez, différentes quantités de fer et de cuivre sous forme de chlorure ferrique, de sulfates ferrique et ferreux, citrate d'ammonium et de fer, sulfate cuivrique. Egalement on a étudié le vin démétallisé à l'acide du ferrocyanure de potassium. Les essais ont duré 2 mois.

Le tableau XV résume les résultats des expériences effectuées par les Œnologues mentionnés.

Il ressort de l'examen de ces résultats que le fer ferrique et le cuivre augmentent le potentiel au début des expériences ; ensuite, le potentiel baisse, mais sans atteindre la valeur de l'essai de contrôle. Par contre, le sulfate ferreux et le citrate de fer et d'ammoniaque diminuent le potentiel au début pour le ramener en fin d'essai vers le potentiel de l'essai du contrôle.

En présence d'une petite quantité introduite de fer, jusqu'à 12 mg par litre, on obtient un vin ayant le goût et le bouquet du Jérez. Les vins plus fins et plus harmonieux se forment en présence du cuivre, qui favorise l'accumulation des acétals et des esters neutres.

Le fer ferreux et la concentration élevée du fer ferrique agissent défavorablement sur la qualité du vin. La démétallisation du vin conduit aux vins de Jérez instables, de mauvaise qualité. L'addition simultanée du fer ferreux et du cuivre donne naissance au vin de qualité moyenne.

Le pH du vin initial était de 3,55. L'addition des sels de fer et de cuivre, ainsi que la démétallisation du vin, ont déterminé l'augmentation du pH jusqu'à 3,8-3,9. Le voile des levures de Jérez est très actif et stable en présence de cuivre. D'ailleurs, dans tous les échantillons, le développement des levures a été bon avec la formation d'un voile continu.

b) **Par le traitement thermique en présence de l'air.**

Le chauffage des vins constitue un des plus anciens procédés du traitement des vins utilisé, soit pour l'accélération des réactions d'oxydation, s'effectuant dans les conditions naturelles très lentement, soit pour l'amélioration de leurs indices organoleptiques. Le traitement thermique peut se faire par exposition au soleil, pratique bien ancienne, ou dans des locaux spéciaux ou, enfin, à l'aide d'appareils spéciaux, dans tous ces cas, soit en présence d'air, soit en son absence. Pour mieux délimiter ces deux techniques bien différentes GUERASSIMOV et POLITOVA-SOVZENKO (41) ont proposé de réserver au premier mode de traitement le terme « madérisation » en raison du rôle particulier de l'oxygène de l'air ; le traitement à l'abri de l'air correspond à des processus tout-à-fait différents par rapport au premier et caractérisé par la baisse du potentiel d'oxydo-réduction. En raison de cette différence la madérisation doit être considérée comme une méthode de préparation des vins spéciaux du type Madère ou des vins du type California Sherry. Par contre, le traitement thermique à l'abri de l'air rentre dans la catégorie des procédés utilisés pour accélérer la maturation des vins. Par conséquent, les modifications du potentiel au cours de l'application de ce traitement au vins serait étudié dans le chapitre consacré à la maturation des vins.

TABLEAU XV

Variante (Quantité de métal ajouté mg/litre)	Teneur totale mg/litre		Acides vol. g/litre	mg/litre			Potentiel $E_H mV$		Caractéristique organoleptique
	Fer	Cuivre		Aldéhyde	Acétals	Esters	Au début	A la fin	
Vin initial	8,2	0,85	1,08	41	16	114	360	—	—
Chlorure ferrique :									
8,8	17	0,85	0,55	854	132	168	380	370	Arome de Jérez net.
12,2	20,2	0,85	0,52	950	145	162	380	360	*Idem*
17,6	25,8	0,85	0,48	838	114	162	390	360	Jérez dur, non harmon.
25	33,2	0,85	0,52	832	121	168	410	380	*Idem*
Sulfate ferrique :									
12	20,2	0,85	0,48	950	125	150	380	360	*Idem*
25	33,2	0,85	0,52	828	141	173	410	380	Jérez désagréable, non harmon.
Citrate de fer et d'ammonium :									
9,3	18,1	0,85	0,48	621	89,6	168	350	340	Vin agréable, bouquet de Jérez.
18,7	26,9	0,85	0,52	673	74,0	172	340	340	Goût et bouquet de Jérez.
Sulfate ferreux :									
12	20,2	0,85	0,48	803	149	162	350	330	Vin désagréable, madérisé.
Sulfate cuivrique :									
3,6	8,2	4,45	0,48	971	168	176	400	390	Bouquet, goût de Jérez, vin agréable.
7,2	8,2	8,05	0,44	991	171	183	410	380	Bon Jérez, harmonieux,
10	8,2	10,85	0,36	849	145	176	410	380	Bon Jérez.
15	8,2	15,85	0,46	759	153	183	420	400	Vin à caractère de Jérez.
Sulfate cuivrique : 10 *Sulfate ferreux :* 12	20,2	10,85	0,52	924	145	150	440	340	Jérez à goût aldéhydrique.
Démétallisation	3,2	0,42	0,68	602	120	132	—	—	Vin désagréable, aqueux.
Contrôle	8,2	0,85	0,48	599	126	150	360	330	Vin à goût et avec bouquet de Jérez.

Un court rappel des travaux relatifs à la pasteurisation, à la madérisation et au traitement thermique à l'abri de l'air a été donné dans notre mémoire concernant la maturation des Vins Doux Naturels (42-I).

1° *Vins du type Madère.*

Les vins de Madère secs demandent 10-12 ans de soins en futailles. Pour activer les phénomènes d'oxydation, les habitants de cette île recourent à la chaleur du soleil, à de grandes étuves dans lesquelles ils placent fûts et bouteilles ; ils obtiennent ainsi en 8 ou 10 mois l'amélioration la plus rapide de leurs vins (*op. cit.* (1-*a*) p. 240). Cette pratique a pris une extension générale, étant plus économique par rapport aux traversées maritimes de l'équateur ou à l'insolation solaire. L'étude théorique de la madérisation restait longtemps très peu développée. Les modifications du potentiel d'oxydoréduction ont été étudiées en 1939 par OUNGOURIAN, KALOUGUINA et ZOUEVA (43). En 1927, OUNGOURIAN a effectué les recherches sur les modifications chimiques en fonction de l'admission de l'air, de la température, de la durée du chauffage ; cet œnologue a établi une relation entre l'accumulation des aldéhydes, des esters et le degré de la madérisation (44). Le même auteur (45) a montré le rôle des sortes de raisin, des procédés de traitement thermique... etc. Enfin, OUNGOURIAN et FROLOV-BAGREEV ont mis en évidence l'influence des enzymes sur les processus de la madérisation (46). Tout dernièrement, OUNGOURIAN a effectué de nouvelles recherches sur le chimisme de cette dernière accompagnées de mesures du potentiel oxydo-réducteur (47),

α) MODIFICATIONS DU POTENTIEL AU COURS DE LA MADÉRISATION

Nous n'avons pas pu consulter la publication d'OUNGOURIAN, KALOUGINA et ZOUEVA (*op. cit.* (43)) parue en 1939, d'ailleurs, introuvable en Europe. Nous savons que la technique de mesure du potentiel, employée par ces auteurs, comprend quatre déterminations effectuées toutes les 5 minutes ; la moyenne de trois mesures constitue la valeur définitive. DRBOGLAV (*op. cit.* (30)) procédait également de cette manière. KOTCHERGA a démontré dans son travail (48) qu'une telle technique est erronnée ; nous avons également mis en évidence sa grande incertitude (49). Signalons que le mémoire de KOTCHERGA est publié dans les Travaux de l'Institut de l'Industrie Alimentaire de Krasnodar en 1949 ; introuvable en Europe et en Amérique, le fascicule n° 6 a été mis, entre autres, à notre disposition, par les professeurs N. SISSAKIAN et G. AGABALIANTZ, auxquels nous exprimons toute notre reconnaissance. La bibliothèque de la Station Centrale de Recherches sur l'Œnologie, la Cidrerie et les Jus de Fruits à Narbonne, en France, possède également le volume mentionné.

Nous avons déjà analysé le mémoire d'OUNGOURIAN publié en 1950 (*op. cit.* (47)) dans notre publication concernant le potentiel (*op. cit.* (9-*a*)). Les expériences concernant l'influence de l'oxydation sur la madérisation ont été effectuées dans les vins logés dans les fûts et dans les récipients en verre, chauffés dans des locaux spéciaux, et aussi dans les vins mis dans les récipients en verre, chauffés dans des étuves. Le potentiel a été mesuré dans des vins soumis à la madérisation suivant différents modes : les récipients partiellement remplis ; les vins additionnés du perhydrol ou enrichis en fer et en cuivre.

Tout d'abord, les expériences spécialement effectuées ont permis de cons-

tater que l'influence des enzymes dans les réactions de madérisation entre 60° et 70°C est très faible.

Les modifications de la composition chimique des vins madérisés dans les fûts sont considérables : on assiste à l'augmentation de la densité, de l'extrait sec, de l'acide titrable, du pH, des acides volatils et non volatils, des substances tanniques, du sucre, des esters volatils, des aldéhydes ; par contre, la teneur en alcool diminue. Tous ces changements sont dus aux réactions entre les composants du vin, entre ces composants et les substances extraites des parois des fûts, enfin à l'évaporation du vin. Il a été remarqué que le degré de madérisation, établi par l'examen organoleptique, se trouve dans une certaine mesure en relation avec les quantités des esters volatils et des aldéhydes, et aussi de la combinaison de ces teneurs. Nous avons extrait du tableau III du mémoire d'OUNGOURIAN les données concernant le potentiel et le pH pour les présenter dans le tableau XVI.

Il ressort de l'examen de ces données que le potentiel varie de + 370 *m*V à + 460 *m*V. La valeur la plus basse a été notée dans le récipient plein fermé ; en absence d'air, l'oxydation s'effectue aux dépens des substances déjà oxydées. Le potentiel des vins, logés dans les fûts, varie en fonction de la vitesse des réactions et de l'accès de l'oxygène dans les différentes périodes du traitement du

TABLEAU XVI

Durée de la madérisation en jours	Essais	pH	Potentiel E_H en *m*V
0	Riesling, coupage, contrôle	3,04	400
45	Riesling, coupage, essai I ballon plein	3,21	370
45	Riesling, coupage, essai II ballon en vidange ...	3,21	380
45	Riesling, coupage, essai III ballon en vidange avec les copeaux de chêne	3,21	380
5	Riesling, coupage, essai IV, fût vieux de 500 l .	3,21	390
10	*Idem*	3,22	410
15	*Idem*	3,21	410
20	*Idem*	3,06	370
25	*Idem*	3,06	370
30	*Idem*	3,06	370
35	*Idem*	3,04	400
45	*Idem*	3,04	380
0	Essai 5, Riesling, fût neuf	3,04	430
5	*Idem*	3,09	420
10	*Idem*	3,16	400
15	*Idem*	3,16	400
20	*Idem*	3,16	390
25	*Idem*	3,17	400
30	*Idem*	3,13	410
35	*Idem*	3,16	410
45	*Idem*	3,12	460

vin. L'étude du régime oxygéné de la madérisation à l'échelle industrielle dans les fûts, effectuée par KOULNEVITCH (*op. cit.* (10) p. 20), nous montre que la grande masse du vin ne contient ni de l'oxygène dissous, ni des peroxydes. On les décèle seulement dans une mince couche du vin immédiatement au contact avec l'air dans l'espace libre du fût. A la suite de l'aération du vin refroidi, après sa sortie du fût, des peroxydes apparaissent ; toutefois, des aérations successives n'augmentent pas leur indice. Le potentiel et la teneur en peroxydes diminuent en fonction de la distance de la surface du vin. Les peroxydes se forment dans les couches supérieures du vin, ensuite ils diffusent vers les couches inférieures

pour prendre part dans les processus d'oxydation. Les substances formées pendant ces réactions se conservent dans le vin ; mises en présence de l'air elles forment de nouveau des peroxydes. L'absence de toutes les formes de l'oxygène dans les vins démontre que la madérisation dans les fûts à 55°-65°C s'effectue dans les conditions d'une sorte de « faim en oxygène » ; cette circonstance oblige les processus oxydoréducteurs à se dérouler au niveau bas du potentiel.

Le tableau XVII reproduit les données consignées dans le tableau II de la publication de KOULNEVITCH.

TABLEAU XVII

Couche du vin dans le fût	Durée de la madérisation, jours	Indice des peroxydes mg/litre				Potentiel E_H mV tout de suite après refroidissement
		Tout de suite après le refroidissement	Après l'aération du vin dans :			
			1 heure	24 h	48 h	
Moyenne	0	1,15	1,18	1,14	1,15	396
Moyenne	25	0,00	0,17	1,30	1,28	—
Supérieure		0,23	0,46	1,87	1,90	—
Moyenne	52	0,00	0,32	1,43	1,43	—
Inférieure		0,00	0,16	1,20	1,19	—
Supérieure		0,28	0,53	2,02	—	316
Moyenne	75	0,08	0,43	1,66	—	274
Inférieure		0,00	0,22	1,31	—	263

β) INFLUENCE DE QUELQUES FACTEURS

OUNGOURIAN a également étudié l'influence des oxydants et des métaux lourds sur la madérisation.

1. *Oxydants.* — L'addition du perhydrol aux vins blancs et rouges, soumis à la madérisation, a provoqué l'augmentation du potentiel de + 380 *m*V à + 610 *m*V. Après la madérisation, en raison des processus oxydoréducteurs intensifs, effectués en présence des teneurs limitées en oxygène, le potentiel a subi une baisse sensible à + 310-+ 290-+ 280 *m*V. L'examen organoleptique a montré les modifications des propriétés gustatives des vins obtenus dans le sens impropre aux vins madérisés.

2. *Métaux lourds.* — Les essais avec l'addition du fer et du cuivre ont montré que ces métaux jouent le rôle de catalyseurs d'oxydation. En particulier, le fer facilite l'activation des peroxydes formés à la suite de la réaction entre les substances non saturées avec l'oxygène moléculaire. L'activité de ce métal intervient surtout dans les processus oxydatifs secondaires qui perturbent la madérisation ; cette dernière s'effectue plus lentement, mais d'une manière caractéristique dans les vins pauvres en fer.

Nous avons réuni dans le tableau XVIII les résultats des mesures analytiques et potentiométriques cités par OUNGOURIAN dans le tableau VIII de son mémoire.

Il ressort de l'examen des résultats de ce tableau que le vin non traité (essai 2) par le ferrocyanure présente toutes les caractéristiques du vin madérisé. Par contre, le vin traité par le ferrocyanure avait un bouquet moins fort, mais le goût caractéristique du vin de Madère. L'addition du cuivre et du fer

n'a pas donné des résultats positifs ; on ne peut rien conclure en ce qui concerne les relations entre le potentiel et le degré de madérisation ou la teneur en aldéhydes.

TABLEAU XVIII

Vin Pedro.

Nº d'Essai	Nature de l'expérience	Fer tot. mg/l	Cuivre tot. mg/l	Aldéhydes mg/l	Potentiel EH-*m*V Vin trait	Potentiel EH-*m*V Vin madérisé	pH	Dégustation	Degré de madérisation
1	Non traité par le ferrocyanure, madérisé	14	4,1	48	+ 430	+ 430	3,45	Bouquet prononcé de Madère, goût quelque peu brûlant	4
2	Traité par le ferrocyanure, madérisé.	3	1,3	64	—	+ 350	3,5	Bouquet et goût caractéristiques de Madère	3
3	Additionné du fer et du cuivrs à l'état oxydé, madérisé	24	6,2	28	+ 450	+ 320	3,44	Faible bouquet amertume, décalage sensible par rapport auxcaractéristiques de madérisation	2

2º *Vins du type California Sherry.*

En Amérique du Nord, la fabrication des vins du type « California Sherry », basée sur le chauffage des vins à + 50-60ºC pendant quelques mois en présence de l'air, cherche à produire des vins rappelant par leurs propriétés organoleptiques les vins de Jérez. La description des procédés de la fabrication de tels vins se trouve, par exemple, dans l'ouvrage de JOSLYN et d'AMERINE (50).

D'une manière générale, la caramélisation et l'oxydation, nécessaires pour la formation du « rancio », dépendent de la durée de l'opération, de la température et de la présence de l'air ; les métaux lourds, comme le fer et le cuivre sont à éviter. Le chauffage s'effectue soit dans des locaux spéciaux, soit dans des grands fûts munis de serpentins internes avec circulation d'eau chaude ou de vapeur. Il n'existe aucune étude concernant les modifications du potentiel au cours de ce traitement suivant les procédés classiques. En 1938 JOSLYN (51) a appliqué le chauffage électrolytique, à l'aide d'un courant alternatif. Les vins obtenus possédaient seulement le bouquet des vins de Jérez et non leur goût. Les variations des teneurs en aldéhydes ne pouvaient être liées aux modifications du potentiel. Signalons que JOSLYN a utilisé pour les mesures du potentiel un appareil potentiométrique ainsi qu'une résistance mise en série avec les deux électrodes de platine pour diminuer leur polarisation. Au point de vue de la priorité dans le domaine des mesures électrométriques, du potentiel dans les vins JOSLYN se trouve en troisième position après GARINO-CANINA (*op. cit.* (13)).

Parmi les résultats obtenus par JOSLYN, ceux concernant les modifications du potentiel des vins chauffés électrolytiquement et à l'usine suivant le procédé à la vapeur seraient très intéressants à comparer. Malheureusement les données

relatives au procédé industriel sont très aberrantes en raison du retard apporté aux mesures après la prise d'échantillons.

Dans ces conditions, nous nous bornerons à citer les résultats notés au cours du chauffage électrolytique.

Le tableau XIX contient quelques données extraites du tableau VII de la publication de JOSLYN.

On voit que l'augmentation de la teneur en aldéhyde, l'augmentation du pH sont accompagnées de la diminution du potentiel.

Remarquons le bilan de différentes formes d'oxygène au cours du chauffage n'a pas été étudié.

TABLEAU XIX

Chauffage électrique du vin de Carignan. Température-75°C.

Durée du chauffage (jours)	Aldéhyde mg/litre	pH	Potentiel E_H mV
0	29	3,97	+ 406
1	43	3,98	236
2	48	3,99	216
3	61	4,00	216
6	93,5	4,04	216
7	90	4,06	212
9	115	4,07	196
10	114	4,07	200
11	122	4,09	196
13	145	4,11	188

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) *a*) SÉBASTIAN (V.). — Les vins de luxe. 208, 1897, Montpellier-Paris, Coulet-Masson éd. — *b*) CHOVRENKO (M.). — Oenologie spéciale. 1917, d'après le renvoi (3)). — *c*) HEIDE (Von der C.), SCHMITTHENNER (F.). — Der Wein, 175, 1922, Braunschweig, Vieweg Verlag. — *d*) SÉMICHON (L.). — 1914-1924 : Dix ans d'efforts scient. et industr. Paris, Chimie et Industrie, éd. — *e*) GAROGLIO (P.). — Nuovo trattato di Enologia, **3**. 378, 1953, Sansoni Edizione Scientifiche.

(2) PROSTOSSERDOV (N.). — Maladies et défauts du vin (Trad.) 1913. — Propriétés diététiques et médicinales du vin de raisin (Trad.) 15, 1948, Moscou, Pischepromizdat éd. — Sur la classification des vins (Trad.) *Vinodélié i Vinogradarstvo* (Oenologie et Viticulture) S. S. S. R., n° 6, 1939.

(3) GUERASSIMOV (M.). — Classification des vins de raisin (Trad.) *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., n° 1, 1948.

(4) AGABALIANTZ (G.). — Sur la classification scientifique des vins de raisin (Trad.) *Troudy Krasnodarsgago Instituta Pischevoï Promischlenosti* (Trav. Inst. Ind. Alim. Krasnodar) S. S. S. R., n° 6, 3, 1949.

(5) Définition du vin et des vins spéciaux. 34e session plénière du Comité de l'Office Intern. du Vin. *Bull. Office Int. Vin*, **27**, 18, n° 284, août 1954.

(6) GENEVOIS (L.), RIBÉREAU-GAYON (J.). — Le vin., 1947, 70, Paris Herrmann éd.

(7) RODOPOULO (A.). — *a*) Processus oxydoréducteurs au cours de l'élaboration des vins. (Trad.) *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., n° 1, 21, 1952. — *b*) Systèmes oxydables enzymatiques et non enzymatiques du moût et du vin. (Trad.) *Biochimiya Vinodeliya*, n° 4, 211, 1953, Moscou

Ac. Sci. S. S. S. R. éd. — c) Régulation des processus oxydoréducteurs au cours de la production du champagne. (Trad.) *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., nº 10, 21, 1953.

(8) Dourmischidzé (S.). — Transformations des substances tanniques au cours du traitement du traitement du rasin (Trad.) *Biochimiya Vinodeliya* (Biochimie de l'Oenologie) S. S. S. R., nº 4, 170, 1953, Moscou, Ac. Sci. S. S. S. R. éd.

(9) Deibner (L.). — a) Rôle du potentiel d'oxydoréduction et de la nature de différents systèmes oxydoréducteurs pendant les transformations et la maturation des vins. *Rev. Ferm. Ins. Alim.*, Belgique, **8**, nº 1, 7, nº 2, 47, 1953. — b) Principales données actuelles sur les facteurs de la stabilité biologique des vins sucrés ou des vins spéciaux et sur la régulation de cette dernière. *Ibidem*, **8**, nº 6, 211, 1953.

(10) Koulnevitch (V.). — Indice des peroxydes comme indice du degré de l'oxydation du vin. (Trad.) *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., nº 1, 17, 1956.

(11) Flanzy (M.). — Les phénomènes de macération en vinification. *La Revue Vinicole*, **5**, nº 50, 35, 1955.

(12) Nègre (E.). — Un facteur trop méconnu de qualité des vins rouges : le cuvage. *C. R. Ac. Agr. Fr.*, **41**, 363, 1955.

(13) Garino-Canina (E.). — Il potenziale di ossidoriduzione e la tecnica enologica. *Ann. Chim. Applicata*, **25**, nº 5, 211, 1935.

(14) Joslyn (M.), Dunn (R.). — Acid metabolism of wine yeast. — I. The relation of volatile acid formation to alcoholic fermentation. *J. Amer. Chem. Soc.*, **60**, 1137, 1938.

(15) Joslyn (M.). — California wines. Oxydation-réduction potentials at various stages of production and aging. *Ind. Eng. Chem.*, **41**, 587, 1949.

(16) Schanderl (H.). — Die Reduktions-oxydations-potentiale während der Entwicklungsphasen des Weines. Der Wienbau, *Wiss. Beihefte.* Juillet, 191, 1948.

(17) Peynaud (E.). — Sur la formation et la diminution des acides volatils pendant la fermentation alcoolique en anaérobiose. *Ann. Ferm.*, **5**, 321, 1939-1940.

(18) Antoniani (C.). — Condensazione acetoinica e « potere-fermento » dei lieviti alcolici. *Annali Fac. Agr. Univ.*, Perugia, Italie, **3**, 1944 ; *Ann. Chim. Applicata*, **38**, nº 1, 39, 1948.

(19) Ribéreau-Gayon (J.), Peynaud (E.), Lafourcade (Mlle S.). — Sur l'influence de l'aération au cours de la fermentation. *Ind. Agr. Alim.*, **68**, nº 3, 4, 141, 1951.

(20) Vetcher (A.), Loza (V.). — Sur l'importance des vitamines C et B_1 dans la production du champagne. (Trad.) *Troudy Krasnodarskogo Instituta Pischevoï Promischlenosti*, S. S. S. R., nº 3, 233, 1948.

(21) Koch (J.). — a) Der Schwefelbedarf der Weissweine. Der Deutsche Weinbau, nº 13, 5 juillet, 1955. — b) Problème der modernen Kellertechnik in der Veingrosskellerei. *Weinberg und Keller*, **2**, 393, 1955.

(22) Ribéreau-Gayon (J.), Ribéreau-Gayon (P.). — Étude expérimentale de la vinification en rouge. — I. Dispositifs utilisés. *Chim. et Ind.*, **70**. nº 3, 416, 1953. — II. Expérimentation 1952. *Ibidem*, nº 4, 694. — III. Expérimentation 1953. *Ibidem*, **72**, nº 5, 922, 1954.

(23) Dourmischidzé (S.). — Substances tanniques et anthocyannes de la vigne et du vin. (Trad.), 247, 1955, Moscou, Ac. Sci. S. S. S. R., éd.

(24) Priachina (E.). — Modification du potentiel oxydoréducteur au cours de la champagnisation du vin. (Trad.) *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., nº 10, 11, 1945.

(25) Adjemian (N.). — Détermination du potentiel oxydoréducteur dans le champagne (Trad.) *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., nº 9, 23, 1951.

(26) Rodopoulo (A.). — a) Modification du potentiel d'oxydoréduction et

de la teneur en oxygène dans les vins au cours de la champagnisation. (Trad.) *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., n° 9, 3, 1944. — *b*) Régulation du potentiel réeox au cours de la préparation des vins pour la champagnisation. (Trad.) *Ibidem.* n° 3, 34, 1949.

(27) ADJEMIAN (N.). — Dynamique du potentiel d'oxydoréduction au cours du processus de la champagnisation. (Trad.) *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., n° 1, 31, 1952.

(28) FROLOV-BAGREEV (A.), AGAPOV (V.), KALININA (N.). — Utilisation de l'acide sulfureux au cours de la champagnisation. (Trad.) *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., n° 7, 22, 1951.

(29) AGABALIANTZ (G.). — Contrôle chimico-technologique de la fabrication du champagne soviétique (Trad.) 51, 1954, Moscou, Pischepromizdat éd.

(30) DRBOGLAV (U.). — Variation de l'oxygène dissous et du potentiel d'oxydoréduction au cours de la champagnisation des vins suivant le procédé de Chaussepied (Trad.) *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., n° 2, 3, 1940.

(31) RODOPOULO (A.). — Améliorer la technologie de la fabrication du champagne en cuve close. (Trad.) *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., n° 11, 33, 1950.

(32) DEIBNER (L.). — Données actuelles sur les processus de l'oxydation de l'acide tartrique et sur la séparation chromatographique des acides organiques. *Ann. Tech. Agr.*, I. N. R. A., **5**, n° 1, 141, 1956.

(33) VETCHER (A.), LOZA (V.). — Influence de l'acide ascorbique sur le potentiel oxydoréducteur et sur la qualité du champagne (Trad.) *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., n° 4, 22, 1955.

(34) KRASSINSKY (N.), PRIACHINA (E.). — Sur la théorie du vieillissement du vin (Trad.) *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., n° 2,7 1946.

(35) SAÉNKO (M^me^ N.). — Modification du potentiel oxydoréducteur et de la composition du vin au cours de son séjour sous le voile de Jérez (Trad.) *Biochimiya Vindeliya*, S. S. S. R., n° 2, 88, 1948.

(36) DEIBNER (L.). — *a*) Oenométrie, son état actuel, son rôle dans la prévision de certains phénomènes œnologiques. *Revue des Ferm. Ind. Alim.*, **9**, n° 4, 158 ; n° 5, 196, 1954. — *b*) Oenométrie. Quelques faits complémentaires. *Revue Ferm. Ind. Alim.*, **10**, n° 3, 125, 1955.

(37) SAÉNKO (Mme N.). — *a*) Méthode accélérée de fabrication des vins du type Jérez (Trad.) *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., n° 1, 1943.— *b*) Levures de Jérez. (Trad.). *Biochimiya Vinodeliya*, n° 1, 98, 1947, Moscou, Ak. Naouk S. S. S. R., éd.

(38) SISSAKIAN (N.), POPOVA (E.), EGOROV (Y.), POUTCHKOVA (U.). — Sur la nature biochimique des vins de Jérez. (Trad.) *Biochimiya Vinodeliya*, n° 2, 69, 1948, Ak. Naouk S. S. S. R., éd.

(39) SAÉNKO (Mme N.). — Maturation accélérée du Jérez. (Trad.) *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., n° 7, 9, 1953.

(40) SAPONDJIAN (S.), GUEVORKIAN (C.). — Influence des métaux lourds sur le processus de jérezation du vin. (Trad.) *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., n° 11, 18, 1953.

(41) GUERASSIMOV (M.), POLITOVA-SOVZENKO (T.). — Traitement thermique des vins de dessert doux alcoolisés (Trad.) *Biochimiya Vinodeliya*, n° 3, 147, 1950, Moscou, Ak. Naouk S. S. S. R., éd.

(42) DEIBNER (L.), BENARD (P.). — Recherches sur la maturation des Vins Doux Naturels. — I. Influence du traitement thermique prolongé à l'abri de l'air. *Ann. Tech. Agr.* I. N. R. A., **5**, n° 3, 357, 1956. — II. Essai de catalyseurs métalliques. *Ibidem*, 377.

(43) OUNGOURIAN (P.), KALOUGUINA (G.), ZOUEVA (E.). — Potentiel oxydoréducteur au cours de la madérisation des vins (Trad.) *Troudy Vsesojuznago naouchno izsledov. Inst. Vinogradarstva i Vinodeliya* (Trav. Int. Féd. Rech. Scient. Oenol. Vit.) S. S. S. R., 7, 1939.

(44) Oungourian (P.). — Principales modifications chimiques au cours de la madérisation du vin. (Trad.) *Vestnik Vinodeliya Oukraïni* (Messager de l'Oenologie de l'Ukraine) S. S. S. R., n° 5, 1927.

(45) Oungourian (P.). — Expérience du traitement thermique du vin. (Trad.) *Sbornik rabot Donskoï enochim. Laboratorii* (Rec. Trav. du Labor. Oenochim. du Don) S. S. S. R., 1931.

(46) Frolov-Bagreev (A.), Oungourian (P.). — Influence des enzymes sur le processus de la madérisation du vin. (Trad.) *Sbornik rabot Vsesouznago Instituta Vinogradarstva i Vinodeliya* (Rec. Trav. Inst. Fédérale de l'Oenologie et de la Viticulture) S. S. S. R., **6**, 1937.

(47) Oungourian (P.). — Sur le chimisme de la madérisation du vin (Trad.). *Biochimiya Vinodeliya*, n° 3, 102, 1950, Moscou, Ac. Sci. S. S. S. R., éd.

(48) Kotcherga (P.). — Sur la théorie du vieillissement du vin (Trad.) *Troudi Krasnodarskogo Instituta Pischevoï Promyschlenosti* (Trav. Inst. Ind. Alim. de Krasnodar) S. S. S. R., n° 6, 27, 1949.

(49) Deibner (L.). — Recherches sur les techniques de mesure du potentiel d'oxydoréduction dans les jus de raisin et les vins. Détermination de ce potentiel dans quelques jus de raisin et quelques vins. *Ann. Tech. Agr.*, I. N. R. A., **5**, n° 1, 31, 1956.

(50) Joslyn (M.), Amerine (M.).— Commercial production of dessert wines. *Bull. Agr. Exp. Station*, Berkeley, California, n° 651, 103, 1941.

(51) Joslyn (M.). — Electrolytic production of rancio flavor in sherries. *Ind. Eng. Chem.*, **30**, 568, 1938.

ÉVOLUTION DU POTENTIEL OXYDORÉDUCTEUR AU COURS DE LA MATURATION DES VINS

PAR

L. DEIBNER
Station centrale de Tecnologie végétale, Narbonne.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Évolution du vin.
A. — Ses stades.
B. — Ses relations avec le potentiel oxydoréducteur.
II. — Potentiel et maturation des vins.
A. — Maturation naturelle.
B. — Maturation accélérée.
Bibliographie.

I. — ÉVOLUTION DU VIN

A. — Ses stades.

L'achèvement de la fermentation tumultueuse du moût de raisin correspond à la naissance du vin. Sa formation s'effectue au cours de la période qui prend fin avec le premier soutirage. Les modifications chimiques et physiques se poursuivent tout le long des autres phases de l'évolution du vin. L'expérience nous démontre que la courbe de vie d'un vin comprend, d'une façon générale, quatre stades principaux :

1° Naissance.
2° Croissance : *a.* Formation ; *b.* Maturation.
3° Maturité.
4° Sénescence : *a.* Décadence ; *b.* Sénilité.

Si le stade de la naissance et la première étape du stade de la croissance — formation — sont plus ou moins étudiés, par contre, la connaissance des processus de la maturation, de la maturité et de la sénescence s'avère fragmentaire et insuffisante.

La croissance du vin est tributaire, d'une part, des réactions de l'oxydation et, d'autre part, des réactions d'assimilation des composants du vin, comme les réactions de la formation des esters, des acétals et d'autres substances assouplissant le goût et le bouquet non équilibrés au début de son évolution.

La maturation des vins en fûts se déroule en présence de l'oxygène de l'air ; dès la fin des processus d'oxydation, la maturation en bouteilles, en

anaérobie, assure la relève, au point de vue de la conservation des qualités acquises dans les fûts, par d'autres modifications chimiques.

Bien entendu, cette double maturation ne s'applique qu'aux vins de marque, aux vins fins. Les vins ordinaires exigent tout simplement une stabilisation compatible avec les délais s'écoulant entre leur mise au marché et leur consommation. Il va de soi que chaque type de vin comprend ces deux catégories : vins ordinaires et vins de marque. L'évolution d'un vin dépend non seulement de sa sorte, mais aussi de son type, ce qui est compréhensible. Par exemple, les réactions de formation des esters et des acétals s'effectuent plus rapidement au cours de la champagnisation, mais très lentement pendant la maturation des vins de table en bouteilles.

La durée de l'évolution des vins constitue une des caractéristiques importantes de leurs types respectifs.

Le diagramme de PREOBRAJENSKY (1), établi sur les observations de longue date, sur les analyses des vins des collections, illustre bien les stades de l'évolution des vins de différentes origines en fonction du temps et en fonction de leur qualité. Pour cet œnologue les vins du type Jérez sont bien supérieurs par rapport à d'autres vins au point de vue de leurs propriétés organoleptiques. Le bouquet de ces vins, très stable, peut se conserver, comme d'ailleurs, le goût, au-delà de 100 ans.

La figure 1 donne l'idée des courbes de formation et de dégradation des vins de quelques types au point de vue qualitatif seulement.

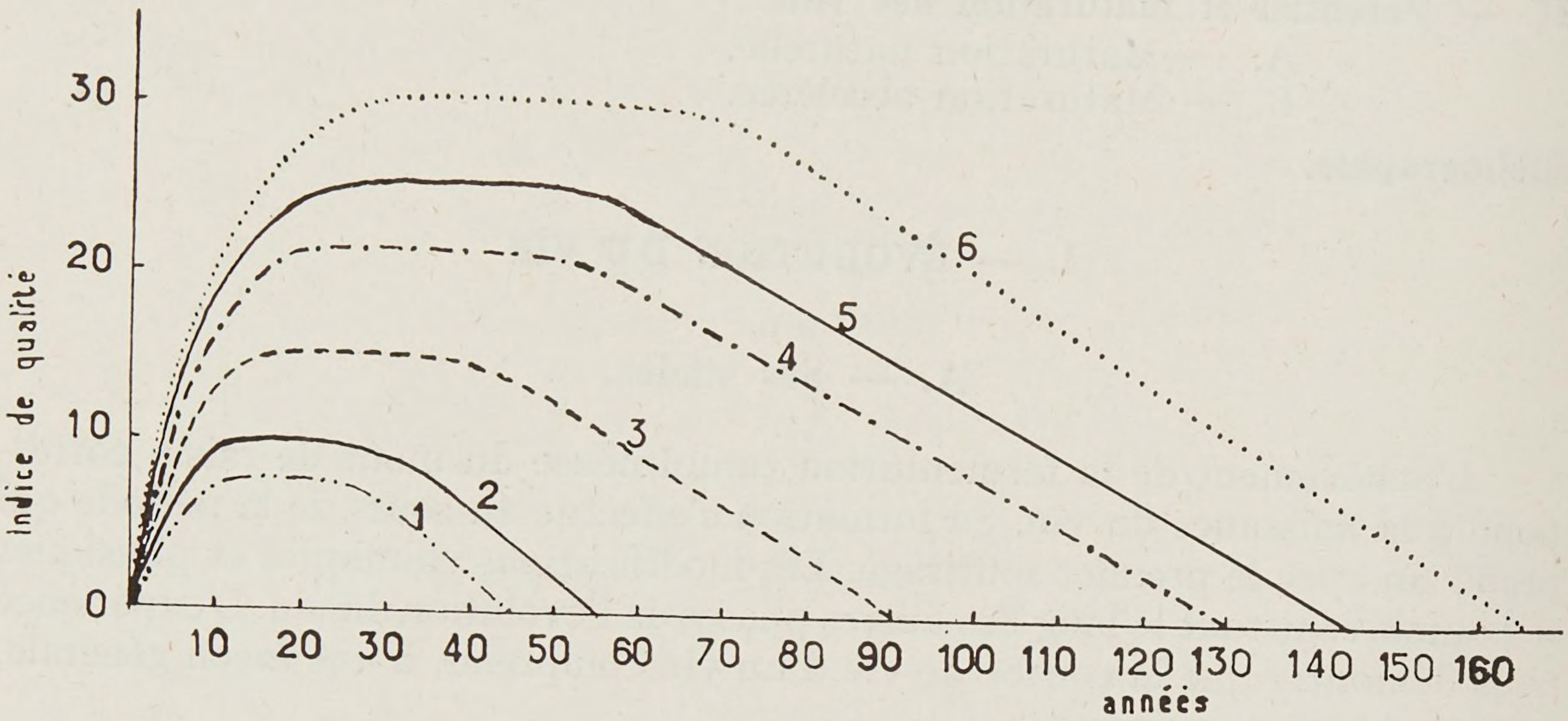


Fig 1. Courbe de formation et de dégradation des vins suivant leur type.

1. Muscat ; 2 Vins de table ; 3. Porto ; 4. Madère ; 5. Vins de Tokay ; 6. Jerez.

B. — Les relations avec le potentiel oxydoréducteur.

Les stades de l'évolution des vins sont caractérisés principalement par les phénomènes oxydoréducteurs ; dans ces conditions, le potentiel oxydoréducteur permet de connaître le sens du déroulement de ces processus. La valeur de ce potentiel se maintient dans des limites étroites déterminées pour chaque âge et pour chaque type de vin. Les vins jeunes possèdent un potentiel plus

élevé en raison des processus d'oxydation ; les vins vieux ont le potentiel plus bas en correspondances avec les réactions de réduction. GUERASSIMOV (2) précise qu'au cours des quatre stades de l'évolution le potentiel diminue au stade de la naissance du vin, augmente pendant la formation et la maturation, diminue avec le vieillissement et, enfin, augmente lors de la dégradation du vin.

La formation du vin, comprenant les soutirages, les aérations, est accompagnée de l'augmentation du potentiel jusqu'à 390-410 *m*V ; à la fin du séjour du vin dans les fûts la baisse du potentiel s'amorce pour atteindre 300-280 *m*V (3). Ensuite, le séjour en bouteilles, destiné à fixer les qualités acquises précédemment, donne lieu à une nouvelle baisse du potentiel jusqu'à 180-280 *m*V. Cette dynamique des modifications du potentiel est propre aux vins de table. Par contre, la champagnisation exige des vins peu oxydés, c'est-à-dire possédant le potentiel le plus bas possible. C'est aussi le cas des vins de muscat. Par contre, pour les vins oxydés du type Porto, Jerez, Madère, on recherchera l'augmentation du niveau du potentiel (*op. cit.* (3) p. 204).

II. — POTENTIEL ET MATURATION DES VINS

Les modifications du potentiel oxydoréducteur au cours de l'élaboration des vins ont été étudiées dans le mémoire précédent. Il convient maintenant de rassembler nos connaissances sur l'évolution de ce potentiel au cours de la maturation naturelle ou spontanée en fûts et en bouteilles. En réalité, les renseignements existants ne sont pas nombreux ; en plus, ils ont un caractère sporadique. Par contre, la maturation des vins au moyen des procédés, qui cherchent à l'obtenir plus rapidement et plus économiquement, a fait l'objet des recherches plus systématiques au point de vue qui nous intéresse.

A. — Maturation naturelle.

Il n'est pas dans nos intentions de présenter ici un exposé sur la nature des transformations au cours de la maturation des vins en fûts et en bouteilles. Il existe un bon nombre d'ouvrages (*op. cit.* (3), (2)), (4), (5), (6), (7) et de mémoires (8), (9), (10), consacrés à ce sujet.

Toutefois, quelques données générales sur les modifications du potentiel en fonction du temps sont citées seulement dans l'ouvrage de FROLOV-BAGREEV et d'AGABALIANTZ (*op. cit.* (3)). Nous les utiliserons dans ce qui suit.

1° **Vins de table.** — Le potentiel du vin jeune après la fin de fermentation est bas : GARINO-CANINA (11) a observé le potentiel de + 255 *m*V dans un vin prélevé au fond d'un fût. Les soutirages fréquents favorisent l'augmentation du potentiel jusqu'à 390-410 *m*V ; ce niveau se maintient tout le long de la première période de la conservation du vin dans les fûts. Ensuite, la limitation de l'accès de l'oxygène de l'air détermine la baisse du potentiel jusqu'à 280-300 *m*V. Au bout de 2-3-5- années de conservation, le vin est prêt à subir la maturation en bouteilles. Bien entendu, il existe une différence entre la durée du séjour en fûts pour les vins rouges et les vins blancs, ces derniers exigeant un délai plus court.

La maturation en bouteilles dure plusieurs années et détermine une diminution sensible du potentiel jusqu'à 280-180 *m*V et même jusqu'à 150 *m*V suivant les observations de KOTCHERGA (*op. cit.* (8-*c*) p. 33). Nous verrons que la baisse peut être encore plus importante pour certains vins. La matura-

tion en fûts ne doit pas se prolonger au-delà d'une limite déterminée ; dans le cas contraire, l'avilissement des qualités acquises est à redouter. Voici quelques données empruntées à la publication de GUEORGUIEV, POPOV et LITCHEV (13).

TABLEAU I

Vin rouge Mavroud (Kroumovo).

Année de récolte	Récipient	pH	Potentiel E_H en mV	Dégustation
1940	fût	3,2	+ 104	Aigre.
1940	bouteille	3,3	194	Bouquet,
1948	fût	3,2	102	Jeune, frais.
1950	fût	3,3	391	Jeune, frais.

Les mesures du potentiel étant faites en 1950, comme nous le supposons, à juste titre, on voit qu'un long séjour en fût est nuisible à la qualité du vin, en admettant l'absence d'autres facteurs de dégradation. Les mêmes œnologues ont donné d'autres résultats concernant les vins de table que nous avons réunis dans le tableau II.

TABLEAU II

Vin année de récolte	Récipient, date de l'opération	pH	Potentiel E_H mV	Dégustation
Rouge Gimza 1945......	embouteillage 1947	3,5	+ 294	Bouquet
» » 1946......	en bouteilles	3,6	18	Bouquet faible
» » 1947......	embouteillage 1950	3,5	162	Bouquet
» » 1949......	en bouteilles	3,3	11	Sans bouquet
» Dimiate 1948......	fûts	3,7	126	Bouquet faible
Blanc 1945......	en bouteilles	3,5	30	Bouquet

Il est intéressant de constater encore une fois que la valeur basse du potentiel ne correspond pas toujours aux qualités supérieures du vin. Son histoire influe beaucoup sur les caractéristiques organoleptiques définitives.

JOSLYN (12) a observé pour les vins rouges de table les potentiels compris entre + 113 *m*V et + 264 *m*V, pour les vins blancs entre + 203 *m*V et + 320 *m*V en fonction de différents traitements et sans tenir compte de quelques écarts par rapport à la limite supérieure ; tous ces vins ont été conservés en fûts. RODOPOULO (*op. cit.* (10)) a attribué la diminution du potentiel dans les vins blancs conservés en bouteilles, jusqu'à 140-150 *m*V, à la formation de l'acide dioxymaléique.

GUEORGUIEV, POPOV et LITCHEV (*op. cit.* (13)) ont mesuré le potentiel dans les vieux vins conservés en bouteilles. Malgré les valeurs basses du potentiel et les teneurs élevées en esters, ces vins ne possédaient pas des qualités agréables. Les auteurs expliquent ces anomalies par l'insuffisance de la technologie d'élaboration de ces vins, plutôt empirique que scientifique.

Ces exemples montrent de nouveau qu'au potentiel bas peuvent correspondre les processus favorables ou défavorables pour la qualité des vins en fonction de leur origine, de leurs constitutions et en fonction des traitements, de soins, de précautions apportés en temps voulu.

Le tableau III reproduit les résultats obtenus par les œnologues bulgares.

TABLEAU III

Vin – Année de récolte	pH	Potentiel E_H mV	Examen organoleptique
Blanc Moselle 1913	3,1	+ 542	Insipide
Blanc Evksinograd 1913	3,5	120	Goût fade
Rouge 1888	3,4	200	Oxydé, aigre
— 1894	3,6	149	»
— 1897	3,3	141	»
— 1906	3,7	110	»
— 1916	3,7	222	»
— 1919	3,4	182	»
Blanc 1935	3,6	130	Aigre
— 1938	3,2	62	Bouquet, bon goût
— 1940	3,2	104	Aigre, mauvais goût

2° **Vins mousseux**. — Le potentiel des vins mousseux après dégorgeage diminue en fonction du temps et au bout de quelques années il atteint la valeur de + 217 — + 222 *m*V (14). KOULNEVITCH (15) a observé pour les différents mousseux les potentiels compris entre + 232 *m*V et + 250 *m*V, plus exactement :

« Champagnes » soviétiques	Potentiel E_H en mV
—	—
Demi-sec dégorgeage 1951	+ 250
Demi-doux dégorgeage 1950	232
Demi-doux dégorgeage 1949	240

Rappelons que DRBOGLAV (16) a également observé les mêmes valeurs du potentiel dans les vins mousseux conservés en bouteilles. Voici les résultats :

Durée de conservation	Oxygène ml/litre	E_H en mV
—	—	—
3 — 4 mois	0 — 0,8	300 — 330
6 — 7 mois	0	200 — 300
10 — 12 mois	0	220 — 270
2 — 2,5 ans	0	200 — 340

Ces vins mousseux, produits suivant le procédé en cuve close, présentaient les défauts de madérisation, d'évent... etc, car leur technologie comportait un régime oxygéné mal réglé, d'où la dégradation des qualités au cours de la maturation.

Nous retrouvons ici la même constatation, maintes fois répétée, que les valeurs basses du potentiel des vins, conservés en bouteilles, ne signifient pas obligatoirement un degré supérieur de leurs qualités organoleptiques. L'acquisition de ce degré dépend de la régulation rationnelle du potentiel au cours d'élaboration des vins ; cette régulation favorise la formation des substances indispensables aux processus de la maturation conduisant à l'amélioration des propriétés organoleptiques.

Il est facile de constater que les régimes oxygénés des vins de table et des vins mousseux, tous conservés en bouteilles, sont caractérisés par les mêmes valeurs du potentiel.

Pour FROLOV-BAGREEV (17) une telle similitude ne signifie pas que les vins mousseux subissent une vraie maturation, la présence du gaz carbonique excluant la chaîne des réactions d'oxydation. A son avis, une minime possibilité de quelques processus oxydoréducteurs constituerait un danger pour les qualités de ces vins. Par contre, la fermentation complémentaire facilite les réactions de formation des esters, des acétals... etc.

Au contraire, Kotcherga (*op. cit.* (8-*c*) p. 34) considère que la maturation des vins mousseux peut s'effectuer en absence d'oxygène, comme c'est le cas pour les vins de table conservés dans les bouteilles. Toutefois, il existe une nette différence entre la nature des substances prenant part dans le processus oxydoréducteurs propres à ces deux types de vins. A notre avis, les mêmes valeurs du potentiel dans ces deux cas ne signifient nullement la similitude des réactions ; d'ailleurs, le régime d'oxydation des vins mousseux n'est pas comparable à celui des vins de table.

L'ouvrage de Frolov-Bagreev (*op. cit.* (17)) donne quelques indications sur la composition des vins mousseux d'origine soviétique et européenne. Nous avons réuni dans le tableau IV les données relatives au potentiel figurant dans la table 33 de cet ouvrage (page 256).

Tableau IV

Provenance	Marques	Pression		pH	Potentiel E_H mV
		Atm.	Tre		
Abraou-Durso	*Champagne soviétique :*				
	Très sec 1938	3,6	17	3,09	+ 367
	» » 1920	2,5	20,5	3,26	313
	» » 1925	2,2	17,5	2,97	319
	» » 1921	2,0	19,0	2,99	327
	Champagne soviétique :				
	Très sec 1932	4,9	20,5	3,14	333
	» » 1939	3,4	13,5	3,02	339
	» » 1928	3,8	20,5	3,12	334
	» » 1936	5,2	19,5	3,19	347
Hiedsieck C° (Reims)...	Dry Monopol Brut 1928	4,6	17,5	3,16	304
Perrier-Jouët C° (Epernay)................	Finest Extra qualibrut	3,4	17,5	3,06	289
Moët et Chandon (Epernay)................	Brut impérial	3,8	14,0	2,97	276
Henkell (Wiesbaden Biebrich)...............	Henkell Trocken	4,0	14,0	3,14	280
Flli Gancia C° (Canelli-Italie)...............	Gancia Asti spumante	3,8	14,2	3,11	273

3° Vins spéciaux.

Sous le terme « vins spéciaux » nous avons réuni ici les vins du type Porto, Madère, Jérez, Muscat, Vins Doux Naturels Français... etc. Les données actuellement existantes concernant le potentiel de ces vins se rapportent aux vins conservés en bouteilles.

D'après Mareca Cortès (18), le potentiel des vins de Jérez est élevé :

Type du Vin	pH	E_HmV
—	—	—
Jérez fino..................	3,4	+ 410
Jérez oloroso	3,2	+ 370

Pour les vins de Porto, Almeida (19) a trouvé les valeurs du potentiel comprises entre + 200 — + 350 pour les pH 3,6 — 3,8.

Koulnevitch (*op. cit.* (15) p. 22) donne les potentiels pour les différents types de vins, conservés aussi en bouteilles, accompagnés des indices des peroxydes et de l'oxygène dissous.

Nous avons réuni tous les résultats dans le tableau V.

TABLEAU V

Vin du type	Oxygène mg/litre		Potentiel E_H *mV*
	Indices des peroxydes O*p*	Indice d'oxygène dissous O*d*	
Madère 1948 (Novotcherkask)	0,12	0,00	+ 252
» 1945 (Massandra)	1,75	»	267
» 1944 »	0,49	»	247
» 1936 nº 83 (Crimée)	0,00	»	208
« 1942 (Arménie)	0,19	»	220
» 1936 »	0,10	»	216
» 1910 »	0,00	»	210
Jérez 1936 »	0,27	»	267
» 1902 (Aschtarac)	0,00	»	211
Porto 1940 (Aloupka)	0,14	»	229
» 1910 (Arménie)	0,00	»	200

Un long séjour dans les bouteilles a provoqué la diminution nette du potentiel. En absence des peroxydes et de l'oxygène dissous le potentiel pour ces types de vin est de + 210 *mV*. GUEORGUIEV, POPOV et LITCHEV (*op. cit.* (13)) ont mesuré le potentiel des vins de dessert du type Porto, conservés en fûts, soumis ou non à l'action de la lumière solaire.

Le tableau VI résume les résultats obtenus par ces œnologues.

TABLEAU VI

Vin Année de récolte	Traitement	pH	Potentiel E_H *mV*	Dégustation
Mistelle, 1945	—	3,8	+ 115	Bouquet faible
Type Porto 1945	—	3,4	+ 217	Bouquet
» » 1946	Fût ouvert, au soleil, 2 ans...	3,5	256	Bouquet
» » blanc 1956	» » ...	3,7	296	Bouquet faible
» » » 1948	Alcoolisé, fût ouvert au soleil, 2 ans	4,0	376	Sans bouquet
» » rouge 1949	Fût ouvert, au soleil, 2 ans...	3,9	374	Sans bouquet

KOULNEVITCH (*op. cit.* (15) p. 20) a étudié le régime d'oxydation des vins du type Porto au cours de leur séjour dans la cave. Nous avons reproduit dans le tableau VII les résultats de dosages effectués par cet auteur. Les mesures du potentiel n'ont pas été effectuées.

TABLEAU VII

Type du vin, année de récolte	Durée de séjour en année	Oxygène mg/litre		
		Oxygène total ot	Peroxydes Op	Oxygène dissous Od
Porto blanc nº 15. — 1951	1	1,75	0,80	0,85
1950	2	1,90	1,40	0,50
1549	3	2,60	1,50	1,10
1948	4	3,50	1,80	1,70
Porto blanc nº13. — 1948	4			
couche supérieure		5,85	1,95	3,90
couche moyenne		3,50	1,80	1,70
couche inférieure		3,20	1,95	0,80

Il ressort de ces résultats que l'indice des peroxydes augmente en fonction du temps ; d'autre part, il diminue suivant la profondeur des couches dans le fût. Contrairement aux vins du type Madère, les vins du type Porto contiennent toutes les formes de l'oxygène ; dans les vins du premier type il est possible de déceler de l'oxygène moléculaire seulement dans une mince couche de vin au contact direct avec l'espace libre du fût.

D'après JOSLYN (*op. cit.* (12)), le potentiel de différents vins de dessert conservés en bouteilles est compris entre + 383 et + 500 *m*V ; dans les vins de Muscatel il varie entre + 219 *m*V et + 396 *m*V.

Nous avons mesuré pour la première fois le potentiel des vins Doux Naturels Français et des vins de liqueur de Muscat préparés en Tunisie (20). Tous ces vins ont été conservés en bouteilles couchées, hermétiquement obturées.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau VIII.

TABLEAU VIII

Vin (nature, provenance, récolte)	Mode de conservation avant l'embouteillage	Mesures potentiométriques			
		Date	Températ.	pH	Potentiel E_H mV
A. — Vins doux naturels					
a) *Vincs blancs*					
Estagel (Pyrénées orient.)					
1950	Bonbonne verre (terrasse)	18-11-54	18	3,38	+ 216
1950	Foudre bois	18-11-54	18	3,4	278
1950	Cuve ciment	19-11-54	15	3,48	220
1951	—	16-11-54	19	3,42	213
1952	—	24-11-54	20	3,5	234
Tuchan (Aude) 1952) ...	—	21-11-54	26,5	3,62	226
b) *Vins rouges*					
Villeneuve-les-Corbières (Aude) 1952	Cuve ciment	5-4-54	19,0	3,12	340
B. Vins de liqueur					
Muscat de Tunisie 1949.	Bouteille cachetée.....	1-12-54	18,5	4,1	94
» » 1950.	—	28-6-54	23,5	3,88	185

B. — Maturation accélérée.

La maturation accélérée des vins peut être obtenue à l'aide des différents procédés, exposés dans les publications de MALVEZIN (21), de JOSLYN (22), de RIBÉREAU-GAYON (*op. cit.* (5) p. 221). Notre mémoire concernant les recherches sur la maturation des Vins Doux Naturels donne également un court aperçu des principaux travaux connus (23-I).

Les modifications du potentiel au cours de l'application des procédés, destinés à accélérer la maturation des vins, ont été observées seulement au cours des recherches relatives au traitement thermique des vins à l'abri de l'air. Ce traitement a été surtout expérimenté sur les vins de dessert alcoolisés et ensuite sur les vins de table rouges.

1° Traitement thermique prolongé à l'abri de l'air.

α) VINS DE DESSERT.

Les recherches de GUERASSIMOV et de POLITOVA-SOVZENKO (24), concernant le traitement thermique des vins de dessert, ont démontré la différence existante entre la madérisation et le chauffage à l'abri de l'air. Le vin jeune alcoolisé utilisé pour les essais comparatifs a été débarrassé de son oxygène dissous par un séjour dans un fût pendant 50 jours. Les essais comportaient quatre variantes au point de vue de l'admission d'oxygène :

I : Remplissage des bouteilles par siphonage en présence du gaz carbonique.

II : La même opération en présence de l'air.

III : Le remplissage en présence de l'air ; tous les 10 jours on saturait le vin avec l'oxygène de l'air par agitation dans les bouteilles à moitié remplies ; ensuite, on y laissait l'espace libre de 25 ml.

IV : Remplissage partiel des bouteilles de 750 ml de capacité avec l'espace libre de 400 ml.

Les traitements duraient 60 jours ; la température de chauffoge était de 70°C ± 5°C.

Les quantités d'oxygène disponible dans les différentes variantes ont été les suivantes :

TABLEAU IX

Variantes	Oxygène dissous mg/litre	Quantité d'oxygène dans l'espace libre des bouteilles-mg/l.	Quantité totals d'oxygène mg/litre
I	Traces	0	Traces
II	4,0	9,2	13,2
III	30,4	55,1	85,5
IV	7,9	266,6	274,5

Les expériences ont démontré qu'en présence de l'oxygène ont lieu les processus de madérisation ; par contre, à l'abri de l'air les caractéristiques des vins s'approchent de celles des vins du type Porto. La madérisation est accompagnée de l'augmentation sensible des teneurs en aldéhydes, en acétals et en esters volatils.

Par contre, en absence de l'air la formation des aldéhydes et des acétals est faible ; pour la variante I on note la diminution des aldéhydes, une petite augmentation des acétals ; pour la variante II les teneurs en ces substances augmentent légèrement.

Nous avons réuni dans le tableau X les résultats des expériences consignées dans le tableau III de la publication de GUERASSIMOV et de POLITOVA-SOVZENKO. Y figurent seulement les données relatives aux essais en absence de l'air ou en présence de petites quantités d'oxygène.

Les modifications du potentiel s'effectuent en fonction de la durée du traitement. L'apparition des caractéristiques propres aux vins du type Porto a été observée déjà au 4e jour du traitement. Le délai de 20 jours paraît suffisant, à notre avis, compte tenu de la température quelque peu élevée utilisée au cours de ces expériences.

TABLEAU X

Vin : alcool 18,79 p. 100 volume ; sucre 3,1 p. 100. Chauffage à 70 ± 5 à l'étuve dans les bouteilles couchées.

Variante	Conditions de l'embouteillage	Date des mesures	Durée du traitement en jours	Oxygène mg/litre	Potentiel E_H *mV*	pH	Intensité de couleur par rapport au témoin	Dégustation
I. — 5 échantillons.	A l'abri de l'air en présence de CO_2.							
	—	11/VIII	0	traces	+ 365	3,53	1,0	Vin limpide.
		14/VIII	4	néant	311,2	3,55	1,4	Limpide, plus harmonieux fruité, caractère du vin de dessert.
	—	21/VIII	11	»	322,1	3,63	1,4	Limpide, harmonieux, fruité, caractères du vin de dessert.
	—	30/VIII	20	»	321,3	3,61	1,8	Limpide, fruité, caractères du vin de Porto.
	—	10/X	60	»	295,9	3,62	3,3	Légèrement trouble, caractères du vin de Porto non fruité.
II. — 5 échantillons.	En présence de l'air.							
	—	11/VIII	0	4,0	379,3	3,51	1,0	Limpide.
	—	14/VIII	4	4,3	398,8	3,52	2,5	Limpide, caractères du vin de Porto.
	—	21/VIII	11	néant	301,5	3,63	2,7	Limpide, caractères du vin de Porto très nets.
	—	30/VIII	20	»	309,0	3,57	2,6	Limpide, caractères du vin de Porto.
	—	10/X	60	»	270,8	3,69	2,8 (après fil tration)	Trouble, dépôt, couleur brun, caractères du vin de Porto.

Lors de ses recherches sur l'influence du traitement thermique sur la composition du vin, POLITOVA-SOVZENKO (25) a fait appel à la température de + 60°C. Les essais ont mis en évidence le rôle de la régulation du régime d'oxydation des vins et l'influence des délais du traitement, ce qui permet d'obtenir une gamme de bouquets en partant d'un même vin. Les modifications de la composition chimique, du potentiel des vins traités sont d'autant plus nettes que la quantité d'oxygène mise en œuvre est plus considérable.

Voici les données concernant les variations du potentiel en fonction du régime d'oxydation.

TABLEAU XI

Variante	Quantité d'oxygène utilisé mg/litre	Potentiel E_H mV	
		Début	Au bout de 60 jours
I	—	+ 355	+ 296
II	12	372	270
III	300	377	272

POLITOVA-SOVZENKO a confirmé les résultats obtenus précédemment :

— en absence de l'air, le traitement communique au vin les caractères du vin du type Porto, ensuite apparaissent le goût et le bouquet des vins vieux ; en présence de l'air on observe la madérisation.

GUERASSIMOV et POLITOVA-SOVZENKO (*op. cit.* (24)) ont également utilisé le chauffage prolongé des vins à 40°-45° à l'abri de l'air, pendant 10 jours. D'ailleurs, le chauffage à de telles températures donne des vins de meilleure qualité par rapport au traitement rapide aux températures plus élevées.

Les modifications du potentiel au cours du traitement prolongé à l'abri de l'air à la température de 40°-45°C n'ont pas été étudiées.

Les avantages d'un tel traitement nous ont paru bien évidents pour essayer son application aux Vins Doux Naturels. Ces vins, dont la production est localisée dans le midi de la France, occupent une place de choix dans l'économie du Pays.

Les essais d'orientation ont été effectués dans les conditions du laboratoire sur les vins jeunes rouges et blancs. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'un mémoire publié ici-même (*op. cit.* (23-I)).

Nous n'insistons pas sur les mérites du traitement prolongé à l'abri de l'air à la température de 40°-45°C. Les exemples donnés dans notre mémoire sont suffisamment éloquents. Disons que la baisse du potentiel peut être sensible ou insignifiante et que les modifications organoleptiques peuvent s'effectuer sans être accompagnées de celles du potentiel.

β) VINS DE TABLE.

Nous avons cherché à appliquer le traitement thermique à l'abri de l'air aux vins de table rouges du type Corbières (Aude), mai les résultats obtenus n'ont pas été intéressants, malgré quelques améliorations constatées.

GUEORGUIEV, POPOV et LITCHEV (*op. cit.* (13)) ont également étudié l'incidence du traitement prolongé à l'abri de l'air sur les vins rouges bulgares. Ces vins ont été chauffés dans les bouteilles 39 jours à + 35° + 40°C et 10 jours à + 85° + 90°C.

Nous savons déjà que ces auteurs ont constaté une relation entre l'augmentation des teneurs en esters, la diminution du potentiel et l'amélioration des propriétés organoleptiques.

Il a été observé que dans tous les cas le traitement à 90°C altère la qualité des vins et cela malgré les valeurs basses du potentiel et les teneurs élevées en esters observées à la fin du traitement. Par contre, le chauffage à 40°C favorise la bonification des vins en fonction, toutefois, de leur composition et de leur origine. L'amélioration apparaît dans les vins très acides, ayant le pH bas.

Nous avons réuni dans le tableau XII quelques données signalées par Gueorguiev, Popov et Litchev dans les différents tableaux.

Tableau XII

Vins rouges, récolte 1950.

Chauffage à 35° — 40°*C* — 39 *jours ; à* 85° — 90°*C* — 10 *jours.*

Vin	pH	Potentiel E_H *mV*	Esters totaux en milliéquiv.	Dégustation
Pamid :				
Contrôle	3,6	+ 481	1,94	Jeune, frais.
35°-40°	3,5	432	4,84	Goût plat, manque de fraîcheur.
85°-90°	4,0	164	6,7	Caramélisé, amer.
Mavroud (taille Guyot) :				
Contrôle	3,25	512	3,4	Jeune.
35°-40°	3,4	416	8,3	Caramélisé.
85°-90°	3,4	160	14,86	Caramélisé, amer.
Mavroud (taille en gobelet) :				
Contrôle	3,1	512	5,82	Jeune.
35°-40°	4,1	325	6,10	Bouquet bien prononcé, goût agréable.
85°-90°	4,0	144	15,86	Amer.
Gimza :				
Contrôle	3,4	514	4,84	Jeune.
35°-40°	3,9	363	6,40	Léger, caramélisé, goût de vin liqueur.
85°-90°	4,4	104	13,20	Amer.
Dimiate :				
Contrôle	3,3	531	4,26	Jeune.
35°-40°	3,8	298	9,8	Limpide, goût agréable, caramélisé.
85°-90°	3,9	103	17,46	Amer.
Muscat rouge :				
Contrôle	3,25	502	4,52	Jeune.
35°-40°	3,7	328	6,20	Goût fade, insipide.
85°-90°	3,9	130	8,50	Amer.

Les expériences ont montré que les vins de Pamid, de Muscat rouge, par exemple, ne s'améliorent pas après le traitement. D'une façon générale, les vins à acidité faible (pH élevé) sont à livrer à la consommation tant qu'ils sont nouveaux et frais ; ils ne doivent pas être conservés en fûts. Par contre, le traitement thermique convient aux vins possédant l'acidité élevée. (pH bas).

2° Traitement thermique à l'abri de l'air en présence de catalyseurs métalliques.

L'influence des microéléments sur le potentiel des vins, en présence ou en absence d'air, est extrêmement importante pour l'évolution du vin au cours de sa maturation.

Il ressort des constatations faites par les œnologues soviétiques (26) et signalées dans notre note parue en 1952 (27) qu'il existe un parallélisme entre les teneurs des vins en manganèse et en molybdène et les appréciations organoleptiques.

Les graphiques donnés dans l'ouvrage de FROLOV-BAGREEV et AGABALIANTZ (*op. cit.* (3) p. 193) montrent que les quantités élevées de ces métaux correspondent à une meilleure qualité des vins.

D'après KOTCHERGA (*op. cit.* (8-*c*)), le manganèse, le fer et le cuivre, modifiant leur valence dans le vin, agissent sur son potentiel et, par voie de conséquence, sur sa qualité. Le manganèse assure le freinage d'oxydation, l'accélération des réactions, caractérisés par la diminution du potentiel. Nous avons effectué les recherches d'orientation en vue d'établir les conséquences, au point de vue des propriétés organoleptiques, de l'intervention du manganèse et du molybdène au cours du traitements thermique, à l'abri de lair, des Vins Doux Naturels (*op. cit.* (23-II)). L'étude de l'influence des additions de manganèse et du molybdène, conjointement avec le traitement thermique, a été effectuée sur un Vin Doux Naturel rouge (Grenache rouge), récolte 1952. Les additions de manganèse et de molybdène ont été faites sous forme de sulfate de manganèse et de molybdate de sodium ; ensuite, les vins enrichis ont été chauffés à l'abri de l'air à 40°-45°C. Nous avons effectué les mesures potentiométriques dans quelques vins conservés dans les bouteilles intactes pendant 15 jours après leur traitement.

On constate que la présence du manganèse favorise la diminution du potentiel et l'amélioration des propriétés organoleptiques même sans le traitement thermique. Il existe, sans doute, une relation entre les teneurs en manganèse et la durée du traitement.

D'autres mesures ont été faites sur les vins enrichis en molybdène ou à là fois en molybdène et en manganèse.

Il ressort des résultats obtenus que le potentiel ne diminue pas en présence du molybdène, tandis qu'en son absence, le traitement thermique seul provoque sa baisse. En présence du manganèse l'action du molybdène sur le potentiel paraît s'atténuer. Toutefois, le nombre d'essais n'est pas suffisant pour faire une conclusion définitive. Lors de l'examen organoleptique les vins traités au molybdène ont été reconnus bons et améliorés. Par contre, le vin contenant le maximum des deux métaux accusait nettement l'inconvénient de leur excès et ceci malgré son potentiel assez bas.

En tout cas, ces recherches d'orientation ont démontré l'influence favorable du manganèse et du molybdène conjointement avec le traitement thermique. Il existe donc une possibilité de régulation de la maturation des Vins Doux Naturels.

3° Relation entre le potentiel du vin et son état de maturité.

Il ressort clairement de tout ce qui précède qu'il n'existe pas une relation entre l'âge du vin et son potentiel.

Après avoir effectué un grand nombre de mesures du potentiel dans différents types de vins, placés dans différentes conditions JOSLYN (*op. cit.* (12)) estime également que le potentiel du vin constitue seulement l'indice de son état d'oxydation et non un critère de son âge.

D'ailleurs, l'âge chronologique du vin ne donne aucune garantie concernant le développement de ces qualités.

Par exemple, un vin jeune, conservé à l'abri de l'air pendant plusieurs mois, paraîtra jeune lors de son examen organoleptique et ceci malgré son âge chronologique. La maturité des vins est déterminée par leurs propriétés organoleptiques. Or, comme nous le savons, l'amélioration de ces qualités peut être avancée par la régulation spéciale de la maturation des vins. Dans ces conditions le concept d'âge apparent prend toute sa signification. Comme nous l'avons vu précédemment, la maturation des vins, conservés dans les bouteilles, s'accompagne d'une diminution du potentiel. Cette baisse ne correspond pas obligatoirement à une amélioration des qualités du vin. En effet, les substances responsables de sa dégradation peuvent également se former au niveau bas du potentiel.

Leur apparition n'aura pas lieu, si au cours de la technologie des vins, la régulation du régime d'oxydation et, par conséquent, du potentiel a été effectuée.

Cette condition préalable étant accomplie, le contrôle du potentiel au cours de la maturation du vin permet de suivre l'évolution normale de ses qualités organoleptiques.

Il existe quelques tentatives de caractériser l'état du vin à l'aide d'indices basés sur l'emploi sot du rH 2, soit du potentiel. Toutefois, il leur manque l'expérimentation en grand, sans laquelle aucune conclusion ne peut être obtenue.

C'est ainsi que KOROTKEVITCH et KOUZNETZOVA (28) ont proposé d'évaluer l'effet d'oxydation d'un vin en fonction du temps à l'aide d'une formule faisant appel à la notion du rH 2. Etant donné que le potentiel précise seulement le niveau auquel s'effectuent les processus d'oxydation, sa valeur seule sans facteur « temps » ne peut caractériser l'effet d'oxydation.

Pour calculer cet effet, les œnologues cités utilisent la formule suivante :

$$\frac{(B - 10) \cdot A}{10} = \text{r H 2 jours}$$

B = Moyenne des valeurs du rH 2 correspondant à la période A jours.

10 = Coefficient permettant de simplifier le résultats.

(B — 10) = Grandeur précisant l'activité du potentiel (cette activité est considérée nulle pour rH 2 = 10).

MARECA-CORTÈS (*op. cit.* (18-*o*)) cherche à déterminer l'état « rédox » des vins par les courbes potentiométriques de leur oxydation en fonction du temps à l'aide d'une solution diluée d'iode, le potentiel de départ et de la fin étant toujours les mêmes. L'étude de ces courbes, accompagnées de l'indication de la quantité d'oxydant employée et des résultats de l'examen organoleptique, permet de mieux situer les différences entre les différents vins ou les échantillons d'un même vin. A notre avis, l'emploi d'un indice de maturité, basé sur la valeur du potentiel, propre à chaque type de vin, pourrait rendre éventuellement quelques services utiles (29). Cet indice de maturité est déduit de la connaissance du potentiel optimum moyen et du nombre de jours nécessaires pour l'atteindre à partir d'un potentiel initial.

Pour un même vin conservé à l'abri de l'air, cet indice se calculerait, après avoir mesuré le potentiel actuel Pa et noté le nombre J écoulés, à l'aide de la

formule suivante : $IM = \frac{(Pa - Po) J}{Po C}$ où C est un coefficient de simplification et Po est un potentiel optimum moyen. Toutes ces études sont difficiles en raison du peu de connaissances actuelles sur la nature chimique des substances des vins dont les modifications sont liées au potentiel et aux propriétés organoleptiques.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Preobrajensky (A.). — Nouvelles voies dans la technologie des vins du type Jérez. (Trad.) *Biochimiya Vinodeliya* (Biochimie de l'Œnologie), nº 4, 56, 1953, Moscou, Ak. Naouk S. S. S. R. éd.

(2) Guerassimov (M.). — Maturation et vieillissement du vin. (Trad.), 1939, Moscou, Pischepromizdat.

(3) Frolov-Bagreev (A.), Agaballiantz (G.). — Chimie du Vin (Trad.), 203, 1951, Moscou, Pischepromizdat éd.

(4) Joslyn (M.), Amerine (M.). — Commercial production of dessert wines. *Bull. Agr. Exp. Station*, Berkeley, California, nº 651, 1941.

(5) Ribéreau-Gayon (J.). — Traité d'Œnologie. 48, 1950, Paris et Liège, Béranger éd.

(6) Garoglio (P.). — Nuevo trattato di Enologia. 1953, 3 volumes, Sansoni edizioni scient.

(7) Amerine (M.), Joslyn (M.). — Table wines ; the technology of their production in California. 1951, Berkeley, Univ. California Press. éd.

(8) Kotcherga (P.). — *a*) Influence des métaux lourds sur le potentiel d'oxydoréduction des vins. (Trad.). Thèse, *Inst. Vinogradarstva i Vinodeliya* (Inst. Vit. Oenol.) Krasnodar, S. S. S. R., 1940. — *b*) Sur la théorie du vieillissement du vin (Trad.). *Vinodélié i Vinogradarstvo* (Œnologie et Viticulture) S. S. S. R., nº 1-2, 18, 1943. — *c*) Sur la théorie du vieillissement du vin (Trad.). *Troudi Krasnodarskogo Instituta Pischevoï Promyschlenosti* (Trav. Inst. Ind. Alim. de Krasnodar) S. S. S. R., nº 6, 27, 1949.

(9) Guerassimov (M.). — Accélération de la maturation du vin. (Trad.). *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., nº 8, 5, 1953.

(10) Rodopoulo (A.). — Sur la théorie de la maturation et du vieillissement des vins. (Trad.). *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., nº 7, 31, 1955.

(11) Garino-Canina (E.). — Il potenziale di ossido riduzione e la tecnica enologica. *Ann. Chim. Applicata*, **25**, nº 5, 211, 1935.

(12) Joslyn (M.). — California wines. Oxidation-reduction potentials at various stages of production and aging. *Ind. Eng. Chem.*, **41**, 587, 1949.

(13) Gueorguiev (L.), Popov (L.), Litchev (V.). — L'estérification et le potentiel d'oxydoréduction dans les vins indigènes en relation avec leur maturation et leur vieillissement (Trad.). *Godischnik Vissch Sels. Instituta V. Kolarov* (Annuaire Inst. Sup. Agr.) Plovdive, Bulgarie, **6**, 1, 1950-1951.

(14) Rodopoulo (A.). — Modification du potentiel d'oxydorédudtion et de la teneur d'oxygène dans les vins au cours de la champagnisation. (Trad.). *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., nº 9, 3, 1944.

(15) Koulnevitch (V.). — Indice des peroxydes, comme indice du degré de l'oxydation du vin (Trad.). *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., nº 1, 17, 1956.

(16) Drboglav (U.). — Variation de l'oxygène dissous et du potentiel d'oxydoréduction au cours de la champagnisation des vins suivant le procédé de Chaussepied (Trad.). *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., nº 2, 3, 1940.

(17) Frolov-Bagreev (A.). — Champagne soviétique, technologie de la pro-

duction des vins mousseux. (Trad.), 249, 1948, Moscou, Pischepromizdat édit.
(18) MARECA-CORTÈS (I.). — Apportacion al estudio de los vinos por sus sistemas « redox » ; potenciometria ; aplicationes technicas. *Revista Cienc. Apl.*, n° 36, 97, 1954.
(19) AIMEIDA (de H.). — Contribucao para o estudo dos fenomenos de oxidação-redução no vinho do Porto. *Anais Inst. Vinho Porto*, 1952.
(20) DEIBNER (L.). — Recherches sur les techniques de mesure du potentiel d'oxydoréduction dans les jus de raisin et les vins. — Détermination de ce potentiel dans quelques jus de raisin et quelques vins. *Ann. Tech. Agr.*, **5**, n° 1, 31, 1956.
(21) MALVEZIN (F.). — Le vieillissement artificiel des vins et spiritueux., 1906, Paris, Rousset éd.
(22) JOSLYN (M.). — The possibilities and limitations of the artificial aging of wine. *The Fruit prod. Journal*, 13, n° 7, 208, n° 8, 241, 1934.
(23) DEIBNER (L.), BENARD (P.). — Recherches sur la maturation des Vins Doux Naturels. I. — Influence du traitement thermique prolongé à l'abri de l'air. *Ann. Tech. Agr.* I. N. R. A., **5**, n° 3, 357, 1956. II. — Essai de catalyseurs métalliques. *Ibidem*, 377.
(24) GUERASSIMOV (M.), POLITOVA-SOVZENKO (Mme T.). — Traitement thermique des vins de dessert doux alcoolisés (Trad.) *Biochimiya Vinodeliya*, n° 3, 147, 1950, Moscou, Ac. Sci. S. S. S. R., éd.
(25) POLITOVA-SOVZENKO (Mme T.). — Influence du traitement thermique sur la composition du vin. (Trad.) *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., n° 7, 8, 1954.
(26) *a*) FROLOV-BAGREEV (A.). — *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., n° 6, 1949. — *b*) FROLOV-BAGREEV (A.), TROITZKY (E.). — Sur le rôle des microéléments dans la biochimie du raisin et du vin. (Trad.) *Biochimiya Vinodeliya*, n° 3, 53, 1950, Moscou, Ak. Naouk éd. — *c*) FROLOV-BAGREEV (A.), ANDREEVSKAYA (E.). — Sur le rôle des microéléments en Œnologie. (Trad.), n° 6, 38, 1950.
(27) DEIBNER (L.). — Aperçu sur les recherches effectuées en U. R. S. S. sur le rôle des microéléments pour la biochimie du raisin et du vin. *Ann. Tech. Agr.*, I. N. R. A., 1, 177, 1952.
(28) KOROTKEVITCH (A.), KOUZNETZOVA (K.). — Sur l'étude des réactions d'oxydation dans les vins (Trad.). *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., n° 2, 10, 1951.
(29) DEIBNER (L.). — Potentiel d'oxydoréduction et ses relations avec les propriétés organoleptiques ses Vins Doux Naturels. *Ann. Tech. Agr.*, I. N. R. A., **5**, n° 3, 399, 1956.

EFFET DE DIFFÉRENTS TRAITEMENTS SUR LE POTENTIEL OXYDORÉDUCTEUR DES VINS AU COURS DE LEUR CONSERVATION

PAR

LÉONCE DEIBNER

Station Centrale de Technologie végétale, Narbonne

PLAN DU MÉMOIRE

A. — Exposition à la lumière solaire.
B. — Aération.
C. — Sulfitation.
D. — Froid.
E. — Soutirages, ouillages, coupages.
F. — Collage, tannisage, traitement au charbon.
G. — Traitement au ferrocyanure.
H. — Pasteurisation, chauffage.
I. — Filtration, embouteillage.
J. — Traitements combinés.
Bibliographie.

Lors de la croissance des vins, les différentes opérations technologiques, telles que soutirage, collage, filtration... etc, produisent leurs effets sur la maturation. Il est clair que l'influence de ces opérations sur le potentiel et sur les propriétés organoleptiques des vins est intéressante à connaître. D'ailleurs, la mesure du potentiel peut être utilisée pour contrôler les opérations œnotechnologiques au point de leur nécessité et de leur régularité.

Il existe un certain nombre de recherches, d'ailleurs assez restreint, concernant l'influence de ces opérations, utilisées séparément ou en combinaison, sur le potentiel. Pour rédiger notre mémoire nous avons consulté la totalité des publications connues.

A. — Exposition à la lumière solaire.

Garino-Canina (1) a constaté que le potentiel d'un vin blanc (pH = 3,22), exposé pendant 9 heures à la lumière directe du soleil, baisse sensiblement, de

500 mV à 230 mV, tandis que le potentiel de ce vin, conservé à l'obscurité, varie peu, de 489 mV à 462 mV.

SCHANDERL (2) a mesuré le potentiel d'un vin blanc du Rhin exposé pendant 90 minutes à la lumière solaire directe dans les bouteilles blanches vertes et brunes ; les bouteilles ont été plongées dans un thermostat à 21°C. Voici les variations du potentiel :

	Potentiel en mV	
	Initial	Final
Bouteille verte	140	150
Bouteille brune	140	130
Bouteille blanche	140	100

Comme on le voit, le potentiel baisse sensiblement dans le vin conservé dans une bouteille blanche.

RIBÉREAU-GAYON (3) signale que dans des vins blancs, exposés pendant deux mois d'hiver à la lumière solaire, le potentiel est descendu à 115 ou 160 mV, tandis que les vins conservés à l'obscurité dans une étuve à 23°C présentaient un potentiel de 160 ou 240 mV ; or, dans les vins sulfités en bouteilles depuis une dizaine d'années, le potentiel est de l'ordre de 100 à 130 mV.

B. — Aération .

L'aération du vin peut augmenter son potentiel jusqu'à + 480 mV d'après RIBÉREAU-GAYON (4) et même jusqu'à 580 mV, comme l'ont constaté OUNGOURIAN, KALOUGUINA et ZOUEVA (5).

AIMEIDA (6) a fait des études très intéressantes concernant l'influence d'aération sur les vins de Porto conservés dans les bouteilles. Dès le début, l'augmentation du potentiel devient d'autant plus sensible que sa valeur initiale est plus basse. Au bout de 8 jours d'aération, le potentiel de tous les vins expérimentés s'approche à une limite moyenne comprise entre 440 mV et 460 mV. Voici quelques résultats choisis par nous et réunis dans le tableau I.

TABLEAU I

N° des échantillons	Potentiel E_H en mV						
	Avant l'aération	Après aération au bout de					
		immédiatement	2 heures	12 h.	24 h.	4 jours	8 jours
23	244	280	322	390	400	434	436
24	299	328	354	382	401	442	442
5	330	362	380	410	434	446	448
9	352	357	370	391	428	438	440
30	380	394	400	406	408	426	430
12	445	448	450	452	454	456	456
11	461	466	470	472	472	472	472

JOSLYN (7) a également étudié l'effet d'aération sur le potentiel des vins, type Porto, produits en Californie. S'il existe une relation entre l'aération et le potentiel, elle n'est pas directe. Tout récemment, PAVLOV-GRICHINE (8) a publié une courte communication sur la stabilisation des vins ordinaires sous l'action de l'oxygène de l'air au cours de leur traitement accéléré ne fai-

sant pas appel au froid et à la chaleur. Il est important pour de tels vins, mis sur le marché avant la fin de leur maturation, d'obtenir leur stabilité au point de vue des troubles. L'auteur a comparé les variations des teneurs en oxygène observées au cours de l'application d'un procédé sans emploi du froid et de la chaleur et d'un autre procédé avec le régime habituel.

Les caractéristiques de ces procédés n'étant pas spécifiées, nous ne pouvons qu'indiquer leur durée : 60 jours pour le premier et 100 jours pour le second.

Les vins étudiés étaient du type Porto ordinaire rouge et blanc.

Au cours du traitement pendant 60 jours, les vins ont absorbé 11,2-13,0 ml d'oxygène par litre pour une aération maximum, 5,9-7,4 ml-litre pour une aération moyenne et 3,5-4,0 ml/litre pour une aération minimum. Le procédé comportant le traitement pendant 100 jours a donné lieu à une absorption de 13,9-16,0 ml/litre d'oxygène.

Le tableau II reproduit les résultats obtenus par PAVLOV-GRICHINE en ce qui concerne les teneurs en oxygène et le potentiel des vins traités et mis en bouteilles.

TABLEAU II

Degré d'aération	Quantité d'Oxygène en ml/litre	Potentiel E_H en mV
Maximum	5,9 — 6,0	418 — 520
Moyen	2,9 — 4,1	393 — 458
Minimum	0,2 — 2,5	340 — 355
Contrôle (traitement pendant 100 jours)	3,3 — 3,4	391 — 453

L'auteur indique également les résultats relatifs à la stabilité des vins et à l'examen organoleptique. Les meilleurs résultats par rapport au contrôle ont été obtenus avec l'emploi d'aération minimum. Remarquons que la valeur du potentiel précise l'état d'oxydation du vin, tandis que la teneur en oxygène caractérise seulement la possibilité d'oxydation ultérieure.

DRBOGLAV (9) a pu illustrer ces constatations sur le vin mousseux fabriqué en cuve après sa mise en bouteilles.

Voici les résultats obtenus :

	Teneur en oxygène dissous ml/litre	Potentiel mV
Au moment de l'embouteillage	4,6	410
Après 10 jours	3,8	444

L'augmentation du potentiel indique que l'oxygène dissous passe à l'état combiné ce qui détermine l'augmentation du degré d'oxydation du vin. KOULNEVITCH (10) a étudié le potentiel et les différentes formes d'oxygène des différents vins oxydés conservés longtemps dans les bouteilles avant et après leur aération. Le tableau III reproduit les résultats obtenus consignés dans le tableau VI de la publication de cet auteur.

L'examen de ces résultats fait ressortir l'absence de l'oxygène dissous et peu de péroxydes, ce qui détermine les valeurs basses du potentiel. L'aération

TABLEAU III

Type du vin	Oxygène mg/litre				Potentiel E_H mV	
	Avant l'aération		Après l'aération			
	Indice des peroxydes Op	Oxygène dissous Od	Indice des peroxydes Op	Oxygène dissous Od	Avant l'aération	Après l'aération
Madère 1948 (Novotcherkask)	0,12	0,00	1,30	—	+ 252	—
Madère Massandra 1945	1,75	0,00	3,80	—	267	—
Madère Massandra 1944	0,49	0,00	2,04	—	247	—
Madère nº 83 (Crimée) 1936	0,00	0,00	1,28	—	208	+ 412
Madère (Arménie) 1942	0,19	0,00	1,94	6,58	220	384
Madère (Arménie) 1936	0,10	0,00	1,85	—	216	395
Madère (Arménie) 1910	0,00	0,00	1,83	—	210	395
Jerez (Arménie) 1936	0,27	0,00	1,76	6,76	267	460
Jerez « Aschtarac » 1902	0,00	0,00	1,76	6,76	211	408
Porto « Aloupka » 1940	0,14	0,00	1,20	—	229	398
Porto (Arménie) 1910	0,00	0,00	2,03	—	200	369

intensive provoque l'augmentation nette de l'indice des péroxydes jusqu'à 1,28-3,8 mg/litre suivie de l'augmentation du potentiel. Ces essais montrent la réversibilité entre la formation et la disparition des péroxydes.

C. — Sulfitation.

La sulfitation du vin provoque, comme on le sait, la diminution du potentiel surtout au début. Pour illustrer son influence, nous citerons tout simplement les données de GARINO-CANINA (*op. cit.* (1) p. 214) concernant un vin et un moût.

TABLEAU IV

Addition de l'anhydride sulfureux en 0/00	E_H en mV	
	Vin pH 3,05	Moût pH 3,3
0,0	+ 510	+ 390
+ 0,100	400	378
+ 0,200	394	370
+ 0,600	380	364
+ 0,800	374	362
+ 1,300	371	362
+ 1,800	370	—

Les variations du potentiel dans le moût sont plus faibles ce qui, d'ailleurs, est compréhensible.

D. — Froid.

Comme le remarque SCHANDERL (*op. cit.* (2)), l'augmentation de la température diminue le potentiel du vin, tandis que son refroidissement l'augmente. Toutefois, d'après KOULNEVITCH (*op. cit.* (10)), la formation des per-

oxydes à des basses températures n'a pas été remarquée ; sans doute, elle est très lente.

RIBÉREAU.-GAYON (*op. cit.* (3) p. 29) a précisé que la vitesse de combinaison de l'oxygène est très lente aux basses températures : dans les vins sulfités à + 2°C, la combinaison dure 4 mois et plus dans les vins non sulfités.

Les essais de GUEORGUIEV, POPOV et LITCHEV (11), effectués sur les vins rouges bulgares de récolte 1950, mis en bouteilles bien obturées, ont montré que le potentiel baisse d'autant plus sensiblement que la température est suffisamment éloignée du zéro. Voici les résultats obtenus par ces œnologues : nous les avons groupés dans le tableau V. Les vins ont séjourné au frigidaire à 0°- — 5°C pendant 52 jours et à la cave (de température + 7°- + 8°C) pendant 50 jours.

TABLEAU V

Vin	Contrôle		Frigidaire		Cave	
	pH	Potentiel E_H mV	pH	Potentiel E_H mV	pH	Potentiel E_H mV
Pamid	3,25	+ 481	3,2	+ 370	3,2	+ 407
Mavroud (taille Guyot)	3,25	512	3,2	448	3,2	410
Mavroud (taille en gobelet)	3,1	512	3,1	455	3,6	364
Gamza	3,4	514	3,3	506	3,4	340
Dimiate	3,3	531	3,5	424	3,3	339
Muscat rouge	3,35	502	3,6	471	3,4	370

Il ressort de l'examen de ces résultats que la baisse du potentiel est sensible à la température de la cave. Aux températures inférieures à 0°C les modifications survenues assurent au vin la limpidité et l'amélioration du goût ; cette dernière est due à la précipitation de certaines substances colloïdales influençant défavorablement la dégustation.

E. — Soutirages, ouillages, coupages.

Les modifications du potentiel au cours du premier soutirage sont, comme on le sait, considérables.

Dans notre mémoire précédent (12) nous avons indiqué dans le tableau V les constatations de RODOPOULO (13-c).

L'augmentation du potentiel après le premier soutirage, effectué à la fin de la fermentation, est importante : de 145 mV à 325 mV avec l'absorption de 2,5 ml d'oxygène par litre. Quant au potentiel du vin, obtenu à partir du moût sulfité, son augmentation est moindre : de 140 mV à 205 ml avec l'enrichissement en oxygène de l'ordre de 0,8 ml par litre.

GUERASSIMOV et M^lle^ POLITOVA (14) ont effectué les mesures du potentiel et le dosage d'oxygène au cours des soutirages à l'air libre.

Nous citons un exemple consigné dans le tableau VI.

Les soutirages à l'abri de l'air ne produisent que de faibles augmentations du potentiel et de la teneur en oxygène.

L'ouillage soigné et effectué à temps ne donne pas lieu aux changements du potentiel et d'oxygène.

Ces constatations de Guerassimov et de Mlle Politova sont confirmées par celles d'Ossipov (15-a).

Signalons que cet œnologue considère comme valeur définitive celle mesurée dans 10-15 minutes après la fin du lavage du récipient à électrodes. Ce mode opératoire fait suite à la proposition de Politova-Sovzenko (16).Or, comme l'a démontré Kotcherga (17) et nous-même (18), le potentiel obtenu dans ces conditions est très souvent supérieur à celui observé au moment de sa stabilisation définitive en fonction du temps. Rodopoulo (*op. cit.* (13-a)) a observé les variations sensibles du potentiel, accompagnées d'enrichissement en oxygène, au cours des coupages en présence de l'air.

Le tableau X de notre précédent mémoire (*op. cit.* (12)), relate d'autres résultats obtenus par Rodopoulo (*op. cit.* (13-c)).

Tableau VI

Vin	Traitement	Mesure potentiométrique		Oxygène en ml/litre
		Température	E_H mV	
Vin rouge alcoolisé chauffé précédemment à 60°C	*a*) Après repos.	19,5	291,9	2,3
	b) Après soutirage, succédant au collage.	15	369	6,1
	c) Après repos.	12	376	2,2
	d) Après soutirage.	14,8	409,5	5,8

F. — Collage, tannisage, traitement au charbon.

Nous devons à Schanderl (*op. cit.* (2)), les recherches sur l'influence des différentes opérations telles que le collage, tannisage, traitement au charbon sur le potentiel oxydoréducteur.

Le collage à la gélatine en présence de l'air ou de l'azote augmente le potentiel ; la même constatation en ce qui concerne le collage à la gélatine combiné avec le tannisage. La gélatine chargée positivement enlève les particules chargées négativement ; or, la perte des électrons correspond à l'oxydation. Par contre, le collage à la caséine abaisse légèrement le potentiel puisqu'il enlève moins de particules négatives.

Le traitement au charbon animal favorise l'augmentation du potentiel en raison, d'une part, de l'enlèvement des substances réductrices et, d'autre part, de l'activité sur le vin de l'oxygène absorbé dans le charbon.

Schanderl exprime les résultats en unités du rH_2 sans indiquer le pH. C'est pour cette raison que nous n'avons pu calculer les valeurs du potentiel. L'emploi du rH_2 seul présente maints inconvénients déjà signalés.

D'après Guerassimov et Politova (*op. cit.* (14)), le collage, suivi d'un soutirage en présence de l'air, conduit à l'augmentation du potentiel.

Rodopoulo (*op. cit.* (13-a)) signale que le collage et le tannisage donnent lieu a une faible absorption de l'oxygène due aux propriétés anti-oxydantes du tannin.

G. — Traitement au ferrocyanure.

Les recherches de Mme Smirnova (19) ont montré que le traitement des vins par le ferrocyanure provoque toujours la diminution du potentiel jusqu'à

30 mV. D'après SCHANDERL (*op. cit.* (2)), le traitement influe sur le potentiel tantôt dans le sens de l'augmentation, tantôt dans le sens de la diminution.

H. — Pasteurisation, chauffage.

Au cours de la pasteurisation le potentiel diminue sensiblement (*op. cit.* (14)). D'après LIPISS (20), la diminution est de l'ordre de 62-72 mV pour tous les vins.

Après le refroidissement, le potentiel reste sans changement dans les vins rouges, mais dans les vins blancs, il remonte de 55 mV, ce qui détermine finalement dans ce cas, la baisse de 7-17 mV.

KOULNEVITCH (*op. cit.* (10) p. 19) a évalué la variation des différentes formes d'oxygène ayant lieu pendant la pasteurisation.

TABLEAU VII

Vin du type Porto blanc

Opération	Oxygène mg/litre		
	Total Ot	Peroxydes Op	Dissous Od
Avant la pasteurisation ...	4,7	1,2	3,5
Après la pasteurisation ...	4,9	3,10	1,8
Dans 24 heures après la pasteurisation	4,83	1,22	3,61

Un court réchauffement au cours de la pasteurisation provoque l'augmentation sensible des peroxydes.

Quant aux modifications du potentiel pendant le chauffage des vins en présence ou en absence de l'air, elles ont été signalées dans différentes publications (21), (22), (23), et, en particulier, dans notre précédent mémoire (24).

I. — Filtration, embouteillage.

La filtration et l'embouteillage à l'abri de l'air ne font augmenter que très peu le potentiel (*op. cit.* (14)). OSSIPOV (*op. cit.* (15-a)) a montré que pendant la filtration à l'abri de l'air, le potentiel varie de 6 à 8 mV.

Cet auteur a donné l'allure des modifications du potentiel pour quelques types de vin. Nous avons remplacé la présentation graphique par un tableau VIII.

TABLEAU VIII

Epoque des mesures	Potentiel E_H mV		
	Vin blanc ordinaire	Muscat blanc	Vin type Porto blanc
Avant la filtration	+ 360	+ 386	+ 402
Après la filtration	368	395	410
Avant l'embouteillage	385	397	425
Après l'embouteillage	388	400	427
10 jours après	382	385	420

L'augmentation du potentiel d'un vin blanc avant l'embouteillage s'explique par son enrichissement en oxygène, lors de sa mise dans le récipient desservant la machine à remplissage automatique.

KOULNEVITCH (*op. cit.* (10)), cite un exemple concernant le bilan des formes d'oxygène pendant la filtration d'un Vin « Anapa ».

TABLEAU IX

	Oxygène mg/litre		
	Total Ot	Peroxydes Op	Dissous Od
Avant filtration	2,6	1,16	1,44
Après filtration	7,7	1,16	6,54

On constate que l'indice des peroxydes ne varie pas tandis que la teneur en oxygène dissous augmente.

RIBÉREAU-GAYON (*op. cit.* (3) p. 50) a étudié l'influence du dispositif d'obturation des bouteilles sur un vin blanc sulfité conservé 4 mois en bouteilles. Voici les résultats obtenus :

	Potentiel E_H mV
Bouteille de 750 ml bouchée au liège	+ 168
Flacon bouché à l'émeri	+ 162
Flacon de 125 ml bouché au liège	+ 190

L'auteur a constaté l'insuffisance du bouchage des petits flacons pour les échantillons.

J. — Traitements combinés.

Dans la pratique, les traitements des vins, indiqués précédemment, s'effectuent suivant un ordre choisi pour faciliter l'élimination des substances nuisibles à la stabilité du vin, telles que les métaux lourds, les colloïdes (les substances pectiques, les gommes).. etc. En étudiant la valeur et l'utilisation des différents traitements, GUERASSIMOV (25) considère que la maturation des vins peut être accélérée par l'emploi du froid, de la chaleur, du collage et de la filtration. Tout récemment, MACHAVARIANI (26) a comparé l'influence particulière de chacune des neuf combinaisons de traitements sur le potentiel et sur les qualités organoleptiques d'un vin blanc, destiné à la champagnisation. La combinaison comprenant le tannisage, traitements au ferrocyanure et à la colle de poisson, froid, action de la chaleur a permis d'obtenir un vin limpide, pur, harmonieux, fruité et vieilli.

Nous avons réuni dans le tableau X les données choisies, extraites du tableau I de la publication de MACHAVARIANI. Les termes « collage bleu », « colle de poisson » correspondent au traitement au ferrocyanure et à la colle de poisson.

Précisons que les variantes 4, 5, 6, 7, 8, 9, sont caractérisées par l'aération des vins ce qui explique la perte d'alcool et l'augmentation de l'acidité volatile.

La variante 9 a produit le vin le mieux noté au cours de l'examen organoleptique. Quelques particularités sont à signaler. En premier lieu, le potentiel

le plus bas ne correspond pas au meilleur vin, qui, par contre, est caractérisé par la valeur la plus élevée. D'autre part, la diminution de la teneur en fer peut être obtenue sans recours au ferrocyanure, par les variantes 3 et 5 comportant l'emploi du froid, ce qui permet d'éliminer 33 p. 100 de ce métal. L'action favorable du froid sur l'élimination des composés du fer a été notée aussi par Barbagallo sur les vins de l'Etna (27). Sans doute, ces composés sont de nature colloïdale, comme l'a montré Casale (28). Enfin, la dernière remarque se rapporte au potentiel en relation avec les teneurs en fer. Il est compréhensible que, dans tous les cas, où cette teneur est de l'ordre de 3-4 mg par litre, le potentiel des vins ne dépend pas du système ferriferrosique en vertu des considérations que nous avons exposées dans différents mémoires (29).

Tableau X

Indices	Vin initial 1950	1 Tanisage, collage, filtration	2 Tanisage, collage bleu, à la colle de poisson, filtration	3 Tanisage, froid, filtration	4 Pasteurisation, filtration	5 Pasteurisation, froid, filtration	6 Pasteurisation, tanisage, collage bleu, colle de poisson, filtration	7 Pasteurisation, froid, tanisage, collage bleu, colle de poisson, filtration	8 Tanisage, collage bleu, colle de poisson, filtration, pasteurisation, froid, filtration	9 Tanisage, collage bleu, colle de poisson, filtration, froid, pasteurisation, filtration
Alcool % vol.	11,4	11,4	11,3	11,1	11,1	11,0	11,1	11,0	11,0	11,0
Acidité g/l...	6,4	6,4	6,4	6,1	6,3	6,1	6,3	6,1	6,1	6,1
Acidité vol. g/l.	0,58	0,58	0,61	0,62	0,63	0,63	0,65	0,67	0,66	0,66
Fer mg/l....	12,4	12,1	4,2	8,2	12,0	8,0	3,9	3,9	3,7	3,7
pH	3,06	3,05	3,05	3,06	3,05	3,05	3,05	3,06	3,05	3,05
Potentiel E_H mV.	265	280	270	300	280	300	295	320	335	335
Dégustation..	6,25	6,75	7,5	6,8	7,0	7,2	7,5	7,7	8,0	8,2

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Garino-Canina (E.). — Il potenziale di ossido riduzione e la tecnica enologica. *Ann. Chim. Applicata*, **25**, n° 5, 211, 1935.

(2) Schanderl (H.). — Uber den Einfluss des Entsäuerns verschiedener Schönungen und des Lichtes auf das rH und pH der Weine. *Wein und Rebe, Jahrbuch*, 118, 1950-1951.

(3) Ribéreau-Gayon (J.). — *Traité d'Œnologie*, 1950, Paris-Liège, Béranger éd.

(4) Ribéreau-Gayon (J.). — Contribution à l'étude des oxydations et réductions dans les vins, 1935, Bordeaux, Delmas éd.

(5) Oungourian (P.), Kalouguina (G.), Zoueva (E.). — Potentiel oxydoréducteur au cours de la madérisation des vins. (Trad.) *Troudy Vses. naouchno-izled. Instituta Vinogradarstva i Vinodeliya* (*Trav. Inst. féd. Rech. Sc. Œnol. Vit.*) S. S. S. R. **7**, 1939.

(6) Almeida (de H.). — Contribução para o estudo dos fenómenos de oxidação-redução no Vinho do Porto. *Anais Inst. Vinho Porto*, 1952.

(7) Joslyn (M.). — California Wines. Oxidation-reduction potentials at various stages of production and aging. *Ind. Eng. Chem.* **41**, 587, 1949.

(8) Pavlov-Grichine (S.). — Influence de l'oxygène sur la qualité des vins

ordinaires au cours de leur traitement accéléré. (Trad.) *Vinodélié i Vinogradarstvo* S. S. S. R. nº 2, 58, 1955.

(9) DRBOGLAV (U.). — Variation de l'oxygène dissous et du potentiel d'oxydoréduction au cours de la champagnisation des vins suivant le procédé de Chaussepied (Trad.) *Vinodélié i Vinogradarstvo* (Œnologie et Viticulture) S. S. S. R. nº 2, 3, 1940.

(10) KOULNEVITCH (V.). — Indice des peroxydes comme indice du degré de l'oxydation du vin. (Trad.) *Vinodélié i Vinogradarstvo* S. S. S. R. nº 1, 17, 1956.

(11) GUEORGUIEV (L.), POPOV (L.), LITCHEV (V.). — L'estérification et le potentiel d'oxydoréduction dans les vins indigènes en relation avec leur maturation et leur vieillissement (Trad.) Godischnik Vissch. Selkochoz. Instituta V. Kolarov (*Annuaire Inst. Sup. Agr. V. Kolarov*), Plovdive, Bulgarie, **6**, 1, 1950-1951.

(12) DEIBNER (L.). — Modifications du potentiel oxydoréducteur au cours de l'élaboration des vins de différents types. *Ann. Techn. Agr.*, I. N. R. A. *6*, nº 3, 313, 1957.

(13) RODOPOULO (A.). — *a*) Régulation du redoxpotentiel au cours de la préparation des vins pour la champagnisation (Trad.). *Vinodélié i Vinogradarstvo* S. S. S. R. nº 3, 34, 1949. — *b*) Systèmes oxydatifs enzymatiques et non enzymatiques du moût et du vin (Trad.). *Biochimiya Vinodeliya* (Biochimie de l'Œnologie) nº 4, 211, 1953, Moscou, Ac. Sc. S. S. S. R. éd. — *c*) Régulation des processus oxydoréducteurs au cours de l'élaboration du champagne (Trad.) *Vinodélié i Vinogradarstvo* S. S. S. R. nº 10, 21, 1953.

(14) GUERASSIMOV (M.), POLITOVA (T.). — Modification du potentiel oxydoréducteur au cours des différents procédés du traitement du vin. (Trad.) *Vinodélié i Vinogradarstvo,* S. S. S. R. nº 7, 1947.

(15) OSSIPOV (N.). — *a*) Influence des opérations technologiques sur le potentiel oxydoréducteur du vin (Trad.). *Vinodélié i Vinogradarstvo,* S. S. S. R. nº 7, 18, 1951. — *b*) Sur la caractérisation des processus oxydoréducteurs dans le vin (Trad.). *Ibidem,* nº 12, 17, 1952.

(16) POLITOVA-SOVZENKO (Mme T.). — Sur la méthode de détermination du potentiel d'oxydoréduction dans les vins (Trad.). *Vinodélié i Vinogradarstvo,* S. S. S. R. nº 7, 21, 1952.

(17) KOTCHERGA (P.). — Sur la théorie du vieillissement du vin (Trad.) *Troudy Krasnodarskogo Instituta Pischevoï Promyschlenosti* (*Trav. Inst. Ind. Alim. de Krasnodar*) S. S. S. R. nº 6, 27, 1949.

(18) DEIBNER (L.). — Recherches sur les techniques de mesure du potentiel d'oxydoréduction dans les jus de raisin et les vins. *Ann. Techn. Agric.* **5**, nº 1, 31, 1956.

(19) SMIRNOVA (A.). — Influence du ferrocyanure de potassium sur le potentiel oxydoréducteur du vin (Trad.). *Vinodélié i Vinogradarstvo,* S. S. S. R. nº 12, 1949.

(20) LIPISS (B.). — Sur la régulation du traitement accéléré des vins de table d'après la valeur du potentiel oxydoréducteur. Exposé de la dissertation pour l'obtention du grade du candidat des Sciences techniques. (Trad.) *Institut de l'Industrie Alimentaire de Krasnodar* S. S. S. R. 1956, 16 pages.

(21) GUÉRASSIMOV (M.), POLITOVA-SOVZENKO (Mme T.). — Traitement thermique des vins doux alcoolisés (Trad.). *Biochimiya Vinodeliya,* nº 3, 147, 1950, Moscou, *Ac. Sci.* S. S. S. R. éd.

(22) DEIBNER (L.), BENARD (P.). — Recherches sur la maturation des Vins Doux Naturels. I. Influence du traitement thermique prolongé à l'abri de l'air. *Ann. Techn. Agr.* I. N. R. A. **5**, nº 3, 357, 1956. — II. Essai de catalyseurs métalliques. *Ibidem,* 377.

(23) DEIBNER (L.). — Potentiel d'oxydoréduction et ses relations avec les

propriétés organoleptiques des Vins Doux Naturels. *Ann. Techn. Agr.*, I. N. R. A. **5**, n° 3, 399, 1956.

(24) DEIBNER (L.). — Évolution du potentiel au cours de la maturation et du vieillissement des vins. *Ann. Techn. Agr.*, I. N. R. A. *6*, n° 3, 347, 1957.

(25) GUÉRASSIMOV (M.). — Accélération de la maturation du vin (Trad.). *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R. n° 8 ,5, 1953.

(26) MACHAVARIANI (N.). — Accélération de la maturation des vins destinés à la champagnisation (Trad.) *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R. n° 10, 21, 1953.

(27) BARBAGALLO (L.). — Studio sulla composizione chimica dei vini dell' Etna. *Riv. Vit. Enol. Italie*, **8**, n° 10, 339, 1955.

(28) CASALE (L.). — Le casse ferrica del vino. *Ann. Chim. Applicata*, **24**, 155, 302, 1934. *Ann. Reg. Staz. Sper. Asti*, **1**, 1, 21, 73, 89, 1932-1934.

(29) DEIBNER (L.). — *a*) Données actuelles relatives à la chimie des phosphates de fer, de ses différents complexes et au potentiel oxydoréducteur du système ferriferrosique. *Ann. Ferm. Ind. Alim. Belgique* (à paraître). — *b*) Substances oxydoréductrices et potentiel du vin. *Ibidem* (à paraître). — *c*) Quelques aspects du problème de la prévision des précipitations ferri-phosphatiques dans les vins. — *Ibidem* (à paraître). — *d*) Potentiel oxydoréducteur des vins ; son importance, sa signification, tendances actuelles de la technique de sa mesure. — *Ind. Alim. Agr.* *74*, n° 4, 273, 1957. — *e*) Potentiel et altérations des vins. (à paraître).

Le Directeur-Gérant : B. LACLAVIÈRE.

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 30-8-1957

Dépôt légal: 3e trimestre 1957 *N° d'impression: 557*

UNE MÉTHODE RAPIDE DE DÉTECTION DE LA NON-STÉRILITÉ ÉVENTUELLE D'ÉCHANTILLONS DE LAIT CHAUFFÉ AU-DESSUS DE 100°C

PAR

J. HERMIER

Station centrale de Microbiologie et Recherches laitières,
Jouy-en-Josas

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

II. — Techniques.

A. — Préparation des échantillons de lait chauffé au-dessus de 100°C.
B. — Méthodes d'examen du lait traité.
C. — « Suppléments » ajoutés au lait.
D. — Choix de la température de traitement du lait.

III. — Résultats.

A. — Conséquences de l'addition d'un « supplément » au lait traité.
B. — Choix et mise au point d'une épreuve de stérilité.

IV. — Discussion.

Résumé.

Bibliographie.

I. — INTRODUCTION

La zone utile de fonctionnement d'un appareil de stérilisation du lait correspond à la gamme des températures pour lesquelles tous les germes microbiens sont détruits au prix d'une modification aussi réduite que possible des qualités organoleptiques du lait. Elle est précédée d'une zone de températures inférieures pour lesquelles une partie seulement des germes thermorésistants du lait est détruite. C'est pour cette dernière

zone que dans un travail précédent (6) nous avons indiqué une méthode d'étude bactériologique. Des échantillons d'un même lait, chauffé à différentes températures dans l'appareil, sont prélevés en nombre suffisant pour permettre des comparaisons statistiques et subissent après une incubation à 30°C, une série d'épreuves permettant de déceler la présence ou l'absence d'une altération du lait. Puis les échantillons, pour lesquels ces épreuves ne décèlent pas d'altération, sont ensemencés sur des milieux nutritifs pour vérifier leur stérilité ou constater, au contraire, un développement microbien.

La complexité d'une telle méthode, qui exige beaucoup de temps et de matériel, tient aux faits suivants :

1° Avant tout examen, le lait traité doit subir une incubation, car le nombre de germes survivant au chauffage est trop faible pour qu'ils puissent être decelés aussitôt après chauffage par numération directe en milieu gélosé.

2° Les germes thermorésistants rencontrés sont des germes à l'état de spores appartenant aux genres *Bacillus* et *Clostridium* ; la température et la durée d'incubation doivent donc être choisies de façon à permettre la germination des spores et une multiplication des cellules végétatives suffisante pour être decelée par l'altération visible du lait ou au moins par l'ensemencement sur milieux nutritifs. Mais d'une part, on sait par de nombreuses observations que les spores soumises à un chauffage sub-léthal germent difficilement et seulement après un temps de latence atteignant parfois plusieurs jours ; d'autre part, le lait n'apporte pas toujours tous les composés nécessaires à une multiplication rapide des cellules végétatives. Aussi l'incubation du lait qui a subi un traitement dans un appareil de stérilisation est-elle beaucoup plus longue que celle couramment utilisée pour les bouillons de culture usuels en bactériologie : suivant les auteurs et les circonstances, elle doit atteindre quelques jours (3), une semaine (9), 2 à 4 semaines (4, 6, 10), 10 semaines (1).

3° Même après l'incubation, la multiplication des germes ayant survécu au chauffage n'entraîne pas toujours une modification physico-chimique du lait se traduisant par une altération visible à l'œil nu ou par la précipitation à l'alcool et à l'ébullition ou encore par une variation du pH (6). Aussi, pour les échantillons qui ne présentent aucune de ces altérations, la stérilité ne peut être affirmée qu'après ensemencement du lait incubé en milieux aérobie et anaérobie.

Le but du présent travail est de simplifier la méthode de détection des échantillons non stériles en modifiant l'épreuve d'incubation par l'application au lait d'une technique déjà utilisée pour les conserves (7) et qui consiste à ajouter au lait un « supplément » composé de substances convenablement choisies.

II. — TECHNIQUES

A. — Préparation des échantillons de lait chauffé au-dessus de 100°C.

a) Principe de l'appareil de traitement du lait.

L'appareil de traitement du lait [1] est un modèle réduit et adapté aux besoins du laboratoire de l'appareil industriel que nous avons utilisé dans un travail précédent (6). Le lait, soigneusement mélangé dans un bac d'entrée, est injecté par une pompe dans un caisson rempli de vapeur saturante sous pression. A son entrée dans le caisson il est pulvérisé par une buse et il atteint instantanément la température de la vapeur ; après un séjour d'une fraction de seconde à cette température, il est à nouveau pulvérisé et refroidi dans un deuxième caisson identique au premier, mais maintenu sous vide par une pompe à vide ; de là il s'écoule dans un bac étanche, également sous vide, muni à sa partie inférieure d'un robinet de prélèvement et à sa partie supérieure d'un robinet d'admission d'air avec un raccord fileté permettant la fixation d'un filtre. Les températures dans les deux caissons sont maintenues constantes à ± 0,5°C près par des vannes commandées par un système de régulation de pression. La zone de température utilisable est comprise pour le premier caisson entre 100° et 150°C, pour le deuxième entre 30° et 100°C.

b) Traitement du lait

Le circuit du lait dans l'appareil est préalablement stérilisé par un courant de vapeur d'eau à 120°C pendant 45 minutes ; les robinets de purge, d'admission d'air et de prélèvement sont maintenus légèrement ouverts, de façon à laisser passer un jet de vapeur. Après stérilisation, les caissons et le bac de sortie sont purgés, tous les robinets fermés et les pressions de travail établies dans les deux caissons ainsi que dans le bac de sortie. Le lait préchauffé à 35-40°C est versé dans le bac d'entrée et bien mélangé. Après passage dans l'appareil de la quantité de lait désirée, le bac de sortie est isolé du reste de l'appareil par la fermeture de deux vannes.

c) Prélèvements

Le lait contenu dans le bac de sortie est réparti dans des flacons de 5 litres stériles. A cet effet, chaque flacon est fermé par un bouchon de caoutchouc traversé par trois tubes de verre, le premier pour le remplis-

[1] Appareil construit par les Etablissements Laguilharre à Courbevoie (Seine).

sage, le deuxième pour la répartition, le troisième bouché au coton pour la sortie ou la rentrée de l'air. Le remplissage des flacons est réalisé de la façon suivante : un filtre à air constitué par un tube métallique d'un mètre de long, rempli de coton et préalablement stérilisé, est vissé à l'extrémité du robinet d'admission d'air après flambage de ce dernier au bec Bunsen. Par injection d'air comprimé à travers le tube-filtre le bac est mis en légère surpression pour permettre une sortie rapide du lait. Un tube de caoutchouc stérile fixé au tube de remplissage d'un flacon de 5 litres est adapté à l'extrémité du robinet de prélèvement préalablement flambé. Chaque ballon est ainsi rempli en moins de 20 secondes. La répartition finale en tubes est effectuée au laboratoire. Le ballon est mis sous pression d'air stérile et le lait, à raison de 20 ml par tube, est réparti aseptiquement dans des tubes stériles de 18 mm de diamètre, bouchés avec un bouchon de caoutchouc. Ce volume a été choisi pour permettre le prélèvement et la manipulation faciles d'un nombre suffisant d'échantillons. En effet toutes les séries étudiées sont de 30 tubes pour faciliter les comparaisons statistiques.

B. — Méthodes d'examen du lait traité.

Après remplissage, les tubes de lait sont aussitôt mis à incuber à 30°C pendant un temps déterminé, puis examinés.

a) **Examen bactériologique.**

Une anse de lait est ensemencée en stries sur milieu gélosé en aérobiose de Mossel et Drion (9) (tryptone 0,5 p. 100, extrait de levure 0,25 p. 100, amidon soluble 0,1 p. 100, glucose 0,1 p. 100, gélose 1,5 p. 100, pH = 7,0). La lecture des boîtes s'effectue une première fois après 15 heures et une seconde fois après 72 heures d'incubation à 30°C.

L'ensemencement en milieu anaérobie n'a pas été pratiqué systématiquement mais des essais préliminaires ont montré que :

— la proportion des tubes renfermant une flore d'anaérobies stricts, sans germes aérobies, ne dépasse jamais 5 p. 100 des tubes reconnus non stériles à l'ensemencement en milieux aérobies et anaérobies.

— ces mêmes tubes présentent après incubation à 30°C au moins l'un des trois caractères suivants : altération visible du lait, production de gaz, pH inférieur ou au plus égal à 6,0.

Aussi dans les essais rapportés plus loin, tout tube négatif à l'ensemencement en aérobiose mais présentant l'un de ces trois caractères a été considéré comme non stérile.

b) Epreuves de stabilité du lait.

Altération visible : elle est décelée par l'apparition d'un coagulum plus ou moins important ou par un anneau de sérum clair au-dessous du bouchon de crème([1]). Dans certains cas et surtout après 10 jours d'incubation cet anneau est difficile à distinguer d'un éclaircissement du lait qui se produit même pour les échantillons stériles au cours de l'incubation. Le nombre de tubes altérés visiblement ne peut être estimé que d'une façon approximative et dépend de l'appréciation de l'observateur.

Centrifugation : pour faciliter la détection de l'altération visible, 2 ml de lait sont centrifugés à 1 800 tours par minute pendant 15 minutes. Le tube est considéré comme altéré si la zone claire qui s'est formée à la surface du tube au-dessous de l'anneau de crème est deux fois plus épaisse que celle observée dans du lait frais non altéré et centrifugé dans les mêmes conditions.

pH : la mesure est faite à l'électrode de verre.

Epreuve à l'alcool : présence ou absence de coagulation après mélange à volumes égaux de lait et d'alcool à 68°, additionné de pourpre de bromocrésol (12).

Epreuve d'ébullition : présence ou absence de coagulation après maintien pendant 5 minutes au bain-marie bouillant.

C. — « Suppléments » ajoutés au lait.

La composition des milieux, constituant les « suppléments » ajoutés au lait, sera exposée plus loin dans le paragraphe concernant les résultats. Nous ne donnons ici que leur mode de préparation.

L'amidon soluble, l'extrait de levure et la peptone sont mis en solution à chaud et filtrés, le pH est ajusté à 7,0 puis on ajoute le glucose. La concentration de ces différents produits est 20 fois plus élevée que la concentration finale dans le lait traité. Si le pourpre de bromocrésol est utilisé, la mise en solution s'effectue dans une solution aqueuse de pourpre de bromocrésol à 0,05 p. 100.

La solution est répartie à raison de 1 ml par tube. Les tubes sont bouchés au coton et stérilisés pendant 30 minutes à 110°C, puis chaque bouchon de coton est remplacé par un bouchon de caoutchouc stérile.

Une solution de soude N/2 stérilisée à 120°C est introduite aseptiquement dans chaque tube, à raison de 0,5 ml par tube. Quand le pourpre de bromocrésol est utilisé, cette addition doit être faite juste avant

([1]) L'appareil de chauffage utilisé ne comporte pas d'homogénéisateur et la crème se rassemble dans la partie supérieure du tube au cours de l'incubation à l'étuve.

le remplissage des tubes de lait pour éviter la décoloration du pourpre qui se produit en milieu très alcalin.

Dans les séries témoins de lait sans « supplément », chaque tube reçoit 1,5 ml d'eau distillée avant stérilisation. Ainsi tous les tubes d'un même essai contiennent 1,5 ml de liquide avant d'être remplis de lait.

D. — Choix de la température de traitement du lait.

Pour que les comparaisons statistiques soient possibles entre les pourcentages de tubes positifs à une épreuve déterminée, il ne faut pas que tous les tubes dans chaque série soient ou bien tous positifs ou bien tous négatifs à cette épreuve.

Des essais préliminaires portant sur des livraisons différentes de lait ont montré que, lorsque le lait était chauffé à 120°C, la moitié des tubes, en moyenne,dans chaque série n'était pas stérile à l'ensemencement sur milieu aérobie. Ceci correspond en moyenne, le volume du lait dans chaque tube étant de 20 ml, à 25 germes survivants par litre de lait. C'est donc cette température de traitement (120°C) qui a été utilisée pour tous les essais rapportés plus loin. Cependant, la teneur du lait cru en germe résistant au chauffage à 120°C, est variable et dans quelques essais, les pourcentages de tubes positifs à l'épreuve étudiée furent trop faibles ou trop importants pour être utilisés statistiquement.

Le nombre de germes, présents dans le lait cru [1] et résistant à un chauffage à 100°C pendant 2 minutes, a varié au cours des essais entre 500 et 10 000 par litre de lait, avec une moyenne de 2 500 par litre. Puisqu'en moyenne 25 germes par litre résistent au chauffage à 120°C, le pourcentage de destruction dû à celui-ci peut être estimé à 99 p. 100.

III. — RÉSULTATS

A. — Conséquences de l'addition d'un « supplément » au lait traité.

Nous avons cherché quelles pouvaient être les répercussions du « supplément » ajouté au lait traité sur le développement pendant l'incubation des germes ayant résisté au chauffage et sur les réponses des épreuves de stérilité après l'incubation. La formule du « supplément » qui a été choisie de façon à améliorer les qualités du lait en tant que milieu de culture, est la suivante :

— 25 cc de soude N/2 pour amener le pH à 7,1-7,2 qui est le pH

[1] Lait provenant de l'étable du Centre national de Recherches zootechniques. Jouy-en-Josas.

des milieux de subculture des *Bacillus* et par suite plus favorable que le pH du lait traité (6,65).

— 1 g d'amidon soluble pour favoriser la germination des spores ayant subi un chauffage sub-léthal.

— 1 g de glucose comme aliment énergétique.

— 5 g d'extrait de levure.

Ces doses sont indiquées pour 1 litre de lait.

L'ensemble de ces produits constitue le milieu « M ». Le lait additionné du milieu « M » sera désigné par « lait + M » par opposition au lait sans supplément désigné par « lait ».

1° Evolution de la flore microbienne en cours d'incubation

Au cours de quatre essais successifs comportant chacun deux séries de 30 tubes préparées à partir du même lait, une de « lait » et une de « lait + M », 166 tubes furent reconnus comme non stériles par ensemencement au 6e jour d'incubation. Les 74 autres tubes, reconnus stériles à l'ensemencement au 6e jour d'incubation furent encore reconnus stériles après une incubation supplémentaire de 8 jours (c.-à-d. après une durée d'incubation totale de 14 jours).

Dans un essai où les 30 tubes de chaque série étaient non stériles au 6e jour d'incubation, celle-ci fut poursuivie pendant un mois : 3 tubes altérés visiblement au 9e jour d'incubation devinrent définitivement stériles à l'ensemencement, un tube de « lait » à partir du 16e jour d'incubation et deux tubes de « lait + M » à partir du 28e jour d'incubation.

En conclusion, une incubation de 6 jours est suffisante pour que la non-stérilité des tubes de lait soit décelable, à l'ensemencement, que le lait soit supplémenté ou non. D'autre part, il n'y a pas d'intérêt à prolonger cette incubation.

2° Epreuves permettant d'apprécier la stabilité du lait.

a) *Altération visible*

L'addition au lait du milieu « M » aboutit, en ce qui concerne la vitesse d'apparition de l'altération visible, à des résultats différents selon les essais. Le tableau I montre les résultats obtenus au cours de trois essais comprenant chacun deux séries : une de « lait », une autre de « lait + M ». Dans l'essai *a*), l'altération visible apparaît en premier dans la série « lait + M » ; dans l'essai *b*), c'est dans la série « lait » que l'altération visible apparaît le plus tôt ; l'essai *c*) ne montre pas de différence entre les deux séries.

b) *Autres épreuves*

A partir du même lait chauffé à 120°C, cinq séries de tubes de « lait » et cinq autres de « lait + M » furent préparées et mises à incuber. Aux 3^e^, 7^e^, 10^e^, 12^e^, 14^e^ jours d'incubation, l'une des séries de « lait » et l'une des

TABLEAU I

Apparition de l'altération visible en cours d'incubation

		Nombre de jours d'incubation																
		2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	14	16	18	21	23	28	30
Essai a	Lait	0	—*	2	—	—	8	9	—	9	—	11	13	15	18	18	29	29
	Lait + M.	0	—	2	—	—	11	16	—	27	—	29	29	29	30	30	30	30
Essai b	Lait	—	0	12	28	30	30	—	30	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Lait + M.	—	0	7	19	24	30	—	30	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Essai c	Lait	—	1	—	2	—	13	—	13	—	15	16	—	—	—	—	—	—
	Lait + M.	—	2	—	6	—	9	—	12	—	13	17	—	—	—	—	—	—

* Chiffre non relevé.
Les chiffres dans les colonnes indiquent le nombre de tubes altérés visiblement.

séries de « lait + M » furent choisies au hasard pour subir les épreuves suivantes : ensemencement, centrifugation, épreuve à l'alcool, épreuve d'ébullition, mesure du pH. Sur le tableau II sont reportés les nombres de tubes positifs à chacune de ces épreuves.

L'épreuve de centrifugation n'améliore pas l'observation visuelle de l'altération. Pour les tubes de lait présentant une altération peu étendue et souvent limitée à l'extrême partie supérieure du tube, il est même préférable de s'en tenir à l'observation visuelle sans centrifugation, tout au moins, tant que la durée d'incubation est inférieure à deux semaines.

Un résultat positif (coagulation) à l'épreuve d'ébullition va toujours de pair avec un résultat positif à l'épreuve à l'alcool. Par contre, on trouve en général que plus de la moitié des tubes positifs à l'épreuve de l'alcool sont négatifs à l'épreuve de l'ébullition.

Dans le tableau II figurent les nombres de tubes de « lait » à pH égal ou inférieur à 6,5 et de tubes de « lait + M » à pH inférieur ou égal à 6,8. Ces deux valeurs ont été choisies parce que la mesure du pH des échantillons stériles à l'ensemencement a montré que tous les tubes de « lait » ont un pH supérieur à 6,5 et tous les tubes de « lait + M » un pH supérieur à 6,8. En ce qui concerne les tubes positifs à l'ensemencement, la moitié au plus a un pH inférieur ou égal à 6,5. Par contre au moins 75

Tableau II

Evolution des épreuves de stabilité en cours d'incubation

Nombre de jours d'incubation	Nombre de tubes « positifs » pour chaque épreuve											
	Lait						Lait + milieu M					
	Ensemencement	Altération visible	Centrifugation	Alcool	Ébullition	pH ⩽ 6,5	Ensemencement	Altération visible	Centrifugation	Alcool	Ébullition	pH ⩽ 6,8
3	13	1	0	0	0	0	22	2	0	3	3	12
7	18	14	5	6	2	9	19	9	7	9	6	16
10	18	13	6	8	4	5	17	12	14	8	2	14
12	19	15	6	8	4	6	15	13	14	14	7	14
14	18	16	12	12	1	6	18	17	16	12	5	14

Le nombre de tubes dans chaque série est de 30.

Tableau III

Influence des constituants du « supplément » ajouté au lait

		Essai a						Essai b				Essai c		
	Supplément	—	A + N + G + E	A + N + G + Pe	A + N + G + Pp	A + N	A + N + G	—	A + N + G + E + PBC	A + N + 5 G + E + PBC	A + N + 5 G + PBC	—	A + N + 5 G + E + PBC	N + 5G + E + PBC
Nombre de tubes	Ensemencement positif..........	25	24	25	24	26	26	15	15	14	14	22	22	21
	pH ⩽ 6,8.....		22	12	12	6	23		12	13	10		21	21

Légende : — = pas de « supplément » (série témoin). — A = amidon soluble. — N = soude. — G = glucose 1 $^0/_{00}$. — 5 G = glucose 5 $^0/_{00}$. — E = extrait de levure. — Pe = peptone Evans. — P_p = peptone Prolabo. — PBC = pourpre de bromocrésol.

p. 100 des tubes de « lait + M » ont un pH inférieur ou égal à 6,8, dès le 7e jour d'incubation.

La mesure du pH du lait additionné du milieu « M » semble donc offrir un moyen pour détecter précocement la non-stérilité éventuelle du lait.

B. — Choix et mise au point d'une épreuve de stérilité.

La variation du pH a donc été choisie comme base d'une épreuve de stérilité, en modifiant la formule du milieu « M » de façon à obtenir un maximum de précision et de sensibilité.

La mise en évidence de la variation du pH exige une incubation d'au moins 7 jours, période qui est suffisante, — on vient de le voir —, pour que les tubes non stériles soient positifs à l'ensemencement. Aussi dans tous les essais qui suivent, après une incubation de 7 jours, les tubes de lait étaient ensemencés sur gélose et on mesurait ensuite le pH du lait dans chaque tube. Dans chaque essai, les séries sont considérées comme comparables si les nombres de tubes non stériles à l'ensemencement ne sont pas significativement différents, ce qui est le cas pour les essais des tableaux III et IV.

TABLEAU IV

Influence des constituants du « supplément » ajouté au lait sur les variations du pH.

Supplément	Nombre de tubes				
	Essai b			Essai c	
	A + N + G + E + PBC	A + N + 5 G + E + PBC	A + N + 5 G + PBC	A + N + 5 G E + PBC	N + 5 G + E + PBC
Pourpre de bromocresol gris ou jaune	12	13	10	21	21
pH > 6,8	3	1	5	0	0
6,3 < pH ⩽ 6,8	8	2	6	3	3
5,8 < pH ⩽ 6,3	4	3	1	6	9
pH ⩽ 5,8	0	8	3	12	9

Les chiffres dans les colonnes indiquent le nombre de tubes.

Dans l'essai *a*) du tableau III, le remplacement de l'extrait de levure par la peptone Prolabo ou la peptone Evans à la même concentration finale que l'extrait de levure, entraîne une diminution significative du nombre de tubes à pH inférieur ou égal à 6,8. Il en est de même pour la suppression simultanée du glucose et de l'extrait de levure. Par contre la suppression de l'extrait de levure seul n'entraîne pas de diminution significative.

Le glucose est donc indispensable à l'abaissement du pH : c'est

pourquoi la concentration du glucose qui était de 0,1 p. 100, c'est-à-dire, celle des milieux de culture pour sporulés, a été portée à 0,5 p. 100, celle utilisée dans les épreuves de fermentation. De plus nous avons cherché à simplifier encore la méthode en remplaçant la mesure du pH par le virage d'un indicateur coloré : nous avons utilisé dans ce but le pourpre de bromocrésol qui vire du bleu au gris au-dessous de 6,8. C'est un colorant déjà très employé pour différentes épreuves de fermentation du lait (Hotis test, par exemple) et pour les épreuves de fermentation des sucres destinées à différencier les espèces de *Bacillus*.

Dans l'essai *b*) du tableau III, il n'y a pas de différence significative entre les nombres de tubes à pH inférieur ou égal à 6,8 quand la concentration du glucose passe de 0,1 à 0,5 p. 100. Mais le tableau IV relatif au même essai *b*) montre que les écarts de pH deviennent beaucoup plus grands : 11 tubes sur 13 ont un pH inférieur à 6,3 au lieu de 4 tubes sur 12. La suppression de l'extrait de levure, quand la concentration du glucose est de 0,5 p. 100, entraîne une diminution des écarts du pH : 4 tubes sur 10 ont un pH inférieur ou égalà 6,3 au lieu de 11 tubes sur 13. La concentration de 0,5 p. 100 du glucose paraît donc être à conserver. D'autre part, les résultats donnés par la lecture du virage du pourpre de bromocrésol concordent bien avec ceux donnés par la mesure au pHmètre. L'addition du colorant simplifie donc la méthode sans nuire à sa précision.

La suppression de l'amidon soluble (essai *c*) tableaux III et IV) n'entraîne pas de différence significative dans le nombre de tubes, ni dans les écarts du pH.

La formule proposée pour le « supplément » est donc : glucose 0,5 p. 100 ; extrait de levure 0,5 p. 100 ; soude N/2 2,5 p. 100 (V/V) ; pourpre de bromocrésol 0,0025 p. 100. L'épreuve est positive si la couleur bleue initiale du lait additionné du « supplément » vire au gris ou au jaune.

IV. — DISCUSSION

1° Ensemencement sur milieu nutritif.

La multiplication des germes microbiens ayant résisté au chauffage dans le lait traité à 120°C, peut, si elle se produit, être détectée par ensemencement sur milieux de culture après 6 jours d'incubation. Le délai d'incubation est donc nettement moins important que les 2 ou 3 semaines habituellement préconisées pour l'analyse bactériologique des laits stérilisés. Il prouve que, dans les conditions où nous avons opéré (lait chauffé à 120°C), le temps de latence de germination des spores est relativement bref. Ceci peut être imputé au fait que ce traitement thermique modéré

(99 p. 100 des spores seulement sont détruites)fait subir peu de dommages aux spores qui survivent. En fait, la durée d'incubation des laits stérilisés commerciaux a été fixée à 2-3 semaines parce que l'altération visible du lait apparaît le plus fréquemment au cours de la deuxième semaine d'incubation et non pas, tout au moins à notre connaissance, à partir d'une étude de l'évolution de la flore bactérienne au cours de l'incubation. En ce qui concerne le lait chauffé à 120°C étudié ici, l'apparition de l'altération visible est souvent aussi tardive que dans les laits stérilisés commerciaux. C'est ainsi que dans l'essai a) du tableau I, alors qu'au 4e jour d'incubation tous les tubes de lait sont positifs à l'ensemencement, deux tubes sont altérés au 4e jour, 11 tubes le sont au 14e jour, et 29 le sont au 28e jour d'incubation. Cette lenteur de l'apparition de l'altération visible ne peut être attribuée au temps de latence de germination des spores puisque tous les tubes sont positifs à l'ensemencement au 4e jour.

2° « Supplément » ajouté au lait.

L'incubation du lait additionné du milieu proposé revient à faire une épreuve de fermentation du glucose. Les études consacrées à l'identification des *Bacillus* thermorésistants rencontrés dans les laits stérilisés commercialement ou au laboratoire montrent qu'au moins 70 p. 100 des souches isolées appartiennent aux espèces *B. subtilis* et *B. licheniformis*. Les autres espèces isolées, de fréquence variable suivant les auteurs, appartiennent aux espèces : *B. megaterium, B. cereus, B. pumilus, B. coagulans, B. polymyxa, B. macerans, B. circulans, B. laterosporus, B. brevis* (2, 4, 5, 11). Or Knight et Proom (8) ont montré que toutes ces espèces fermentent le glucose. Nos résultats sont donc en accord avec les travaux de ces auteurs, mais ici l'épreuve de fermentation du glucose est effectuée dans du lait additionné d'extrait de levure.

Il est important de préciser que l'étude de l'épreuve proposée a été faite uniquement avec du lait chauffé à 120°C dans un stérilisateur continu : il reste à savoir si cette épreuve demeure valable ou non pour des traitements à température plus élevée au cours desquels les spores survivantes subissent des dommages plus importants. En fait une élévation de la température de chauffage ne modifie pas la multiplication ultérieure des cellules végétatives et la fermentation du glucose. Seules sont changées les conditions de germination des spores. Ceci se manifeste sous deux aspects : exigences nutritives accrues pour que la germination soit possible et temps de latence plus long pour la germination. Le lait additionné du « supplément » représente un milieu plus riche que le lait, donc au moins aussi favorable à la germination des spores. La seule inconnue reste donc le temps d'incubation qui devra peut-être être prolongé.

En groupant les résultats obtenus avec le milieu proposé (tableau III,

essai b, 3e colonne et essai c, 2e et 3e colonnes), on constate que sur 57 échantillons reconnus non stériles par l'ensemencement, 55, soit 95 p. 100, avaient un pH inférieur ou égal à 6,8.

Cette proportion élevée donne à l'épreuve de fermentation du glucose un avantage considérable par rapport aux autres épreuves rapides (alcool, ébullition).

Sa simplicité permet de l'appliquer à l'étude d'un grand nombre d'échantillons. Aussi nous croyons utile de proposer cette épreuve pour l'étude de la destruction des germes microbiens en fonction de la température dans un appareil de stérilisation du lait. Mais nous pensons que la véritable utilité pratique de cette épreuve se révèlera lors de son application au contrôle journalier d'une chaîne de stérilisation du lait en bouteille en cours de fonctionnement.

C'est dans cette direction que nous orientons nos essais actuels.

RÉSUMÉ

L'examen du lait chauffé à 120°C pendant une fraction de seconde et renfermant encore en moyenne 25 germes thermorésistants par litre a montré que :

1° La non-stérilité du lait peut être mise en évidence par l'ensemencement sur milieu nutritif, après 4 jours d'incubation à 30°C.

2° L'altération visible et les épreuves de stabilité du lait (centrifugation, épreuve à l'alcool, épreuve d'ébullition, mesure du pH) ne peuvent remplacer l'ensemencement.

3° Quand du glucose est ajouté au lait après traitement, il est utilisé au cours du développement des germes microbiens avec production d'acide.

Une épreuve est proposée, basée sur la fermentation du glucose dans le lait traité, en présence de pourpre de bromocrésol comme indicateur de pH, en cours d'incubation.

Reçu pour publication le 28 *mars* 1957.

Nous exprimons notre reconnaissance à M. Mocquot qui, par ses conseils, nous a guidé dans l'orientation initiale et la réalisation de ce travail.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Burton (H.), Akam (D. N.), Thiel (C. C.), Grinsted (E.) et Clegg (L. F. L.). — Some investigations into the batch process of milk sterilization. *J. Soc. Dairy Tech.*, **6**, 98 à 113, 1953.

(2) Candy (M. R.) et Nichols (A. A.). — Some bacteriological aspects of commercially sterilized milk, II. Type of sporeforming bacteria isolated. *J. Dairy Res.*, **23**, 329 à 335, 1956.

(3) DAVIS (J. G.). — A dictionary of dairying. — Leonard Hill Ltd, London, 1955.

(4) FRANKLIN (J. G.), WILLIAM (D. J.) et CLEGG (L. F. L.). — A survey of the number and types of aerobic mesophilic spores in milk before and after commercial sterilization. *J. appl. Bact.*, **19**, 46 à 53, 1956.

(5) GRINSTED (E.) et CLEGG (L. F. L.). — Spore-forming organisms in commercial sterilized milk. *J. Dairy Res.*, **22**, 178 à 190, 1955.

(6) HERMIER (J.) et MOCQUOT (G.). — Étude sur la destruction des microbes et la dénaturation des protéines du lait par un chauffage au-dessus de 100°C. *Ann. Technol.*, **4**, 341 à 357, 1955.

(7) KAPLAN (A. M.), REYNOLDS (H.) et LITCHTENSTEIN (H.). — Significance of variations in observed slopes of thermal death time curves for putrefactive anaerobes. *Food Res.*, **19**, 173 à 181, 1954.

(8) KNIGHT (B. C. J. G.) et PROOM (H.). — A comparative survey of the nutrition and physiology of mesophilic species in the genus Bacillus. *J. gen. Microbiol.*, **4**, 508 à 538, 1950.

(9) MOSSEL (D. A. A.) et DRION (E. F.). — Bacteriological requirements for and testing of sterilized milk and sterilized milk products. *Neth. Milk and Dairy J.*, **8**, 106 à 114, 1954.

(10) MOSSEL (D. A. A.) et MOL (J. H. H.). — A typical case of delayed spoilage in a dairy product incubation test. *Appl. Microb.*, **4**, 69 et 70, 1956.

(11) RIDGWAY (J. D.). — Some recent observations on the bacteriology of sterilized milk. *J. appl. Bact.*, **18**, 374 à 387, 1955.

(12) ROWLANDS (A.), BARKWORTH (H.), HOSKING (Z.) et KEMPTHORNE (O.). — Dye tests as measures of the keeping quality of milk. *J. Dairy Res.*, **17**, 159 à 191, 1950.

LES FACTEURS DU DÉVELOPPEMENT DE L'ACESCENCE DANS LE VIN

PAR

P. DUPUY

Station de Technologie végétale, Versailles (1)

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Méthode utilisée.

II. — Résultats.

1. — Influence de la quantité de germes ensemencés.
2. — Influence de la température.
3. — Influence du pH.
4. — Influence de l'alcool.
5. — Influence des oligoéléments.
 a) Traitement au ferrocyanure.
 b) Traitement au phytate.
6. — Influence des tanins.
7. — Influence de la durée de macération du vin.
8. — Influence de l'addition de glucose et de glycérine.

III. — Conclusion.

La présence d'*Acetobacter* dans les vins n'est pas une conditions suffisante pour en déterminer la piqûre. On remarque en effet que des vins présentent des aptitudes très variables à contracter cette maladie. Les observations courantes ont bien permis de dégager certains facteurs favorables et certains autres défavorables, mais étant donné leur grand nombre, il n'a pas encore été possible de prévoir l'avenir d'un vin contaminé.

I. — MÉTHODE UTILISÉE

C'est donc une étude systématique qui est nécessaire. Un vin donné sera pasteurisé à 80° et réparti en plusieurs échantillons, chacun ne différant du témoin que par un seul facteur. Après ensemencement avec une race définie, on suivra l'augmentation de l'acidité totale, ou on se contentera de noter l'apparition du voile (2).

(1) Travail effectuée à la Station centrale de Technologie des produits végétaux, Narbonne.

(2) Les vins employés pour ces essais avaient des origines et des compositions très variées. On a vérifié qu'ils étaient exempts d'anhydride sulfureux libre à cause de la grande sensibilité des *Acetobacter* à cet antiseptique.

Dans toutes nos expériences, nous avons utilisé la même souche d'*Acetobacter rancens* AB 20 (1). Elle était cultivée avant l'emploi dans le même vin que celui qui servait à l'expérience et était utilisée le troisième jour, après remise en suspension du voile. Cette façon de procéder nous a permis de réaliser des ensemencements à peu près égaux dans les divers récipients de la série.

Nous nous sommes donc attachés à rendre aussi comparables que possible les échantillons d'une même série, sans toujours y parvenir. Malheureusement, il n'est plus possible de comparer entre elles les diverses séries.

Il faut noter que l'ensemencement représente une opération très conventionnelle : en effet les *Acetobacter* ne végètent dans le vin que sous forme de voile ; au lieu d'ensemencer un fragment de ce voile, comme le conseillait PASTEUR, nous avons fait une suspension que nous avons introduite dans la masse du liquide. Cette façon d'opérer respecte fort peu l'écologie des *Acetobacter*, mais elle nous a donné des résultats plus reproductibles que l'ensemencement par fragment de voile. Ces derniers ont rarement la même grandeur ; il arrive aussi qu'ils tombent au fond des récipients, choses qui constituent des irrégularités dans l'ensemencement.

II. — RÉSULTATS

1. — Influence de la quantité de germes ensemencés.

TABLEAU I

Développement de l'acescence en fonction du nombre de germes ensemencés

N°	Ensemencement en ml.	Acide acétique en milliéquivalent par litre		
		Après 3 jours	Après 6 jours	Après 12 jours
1	1	143	725	1 190
2	1	164	775	1 300
3	1/20	143	650	1 165
4	1/20	90	625	1 200
5	1/400	59	575	1 190
6	1/8000	15	188	975
7	0	15	15	15

Essais réalisés dans des fioles cylindro-coniques de 250 ml contenant 150 ml de vin stérile. Ensemencement avec une culture homogénéisée de $47 \cdot 10^6$ cellules par ml.

Le tableau I montre qu'aux premiers stades le développement de l'acescence est en corrélation avec la quantité de germes ensemencés. Au fur et à mesure que les cultures vieillissent, les différences qui existent au début s'amoindrissent.

L'expérience décrite dans le tableau II confirme bien ce dernier résultat.

TABLEAU II

Développement de l'acescence en fonction du temps.

Augmentation de l'acidité en milliéquivalent/litre		
Après 38 heures	Après 81 heures	Après 130 heures
12,4	210	485
19,4	210	460
13,8	212	

Tubes à essais contenant 20 ml de vin rouge, ensemencés avec 0,25 ml d'une culture homogénéisée, agités avant incubation à 27°.

Les différences constatées après 38 heures sont dues à l'impossibilité matérielle de reproduire un ensemencement identique.

Il est fort probable que la multiplication des *Acetobacter* se fait uniquement à partir des cellules qui restent en surface, en particulier de celles retenues par les forces capillaires au contact des parois et du liquide. Pour avoir des vitesses d'acétification identiques, il faut que la répartition des germes dans le milieu soit homogène. On a donc intérêt à agiter les récipients, mais on constate que le ressuyage des parois n'est pas identique dans tous les tubes et nous croyons que c'est la raison pour laquelle on ne peut pas obtenir des résultats absolument identiques d'un essai à l'autre.

La quantité de germes ensemencés influe sur la vitesse de formation du voile, mais dès que le voile est constitué, c'est-à-dire qu'il n'y a plus de multiplication microbienne, les quantités d'acide formées deviennent très voisines. Les faits révélés par ces deux expériences montrent que les séries comparatives devront être répétées plusieurs fois pour éliminer les différences qui pourraient ne provenir que de l'ensemencement.

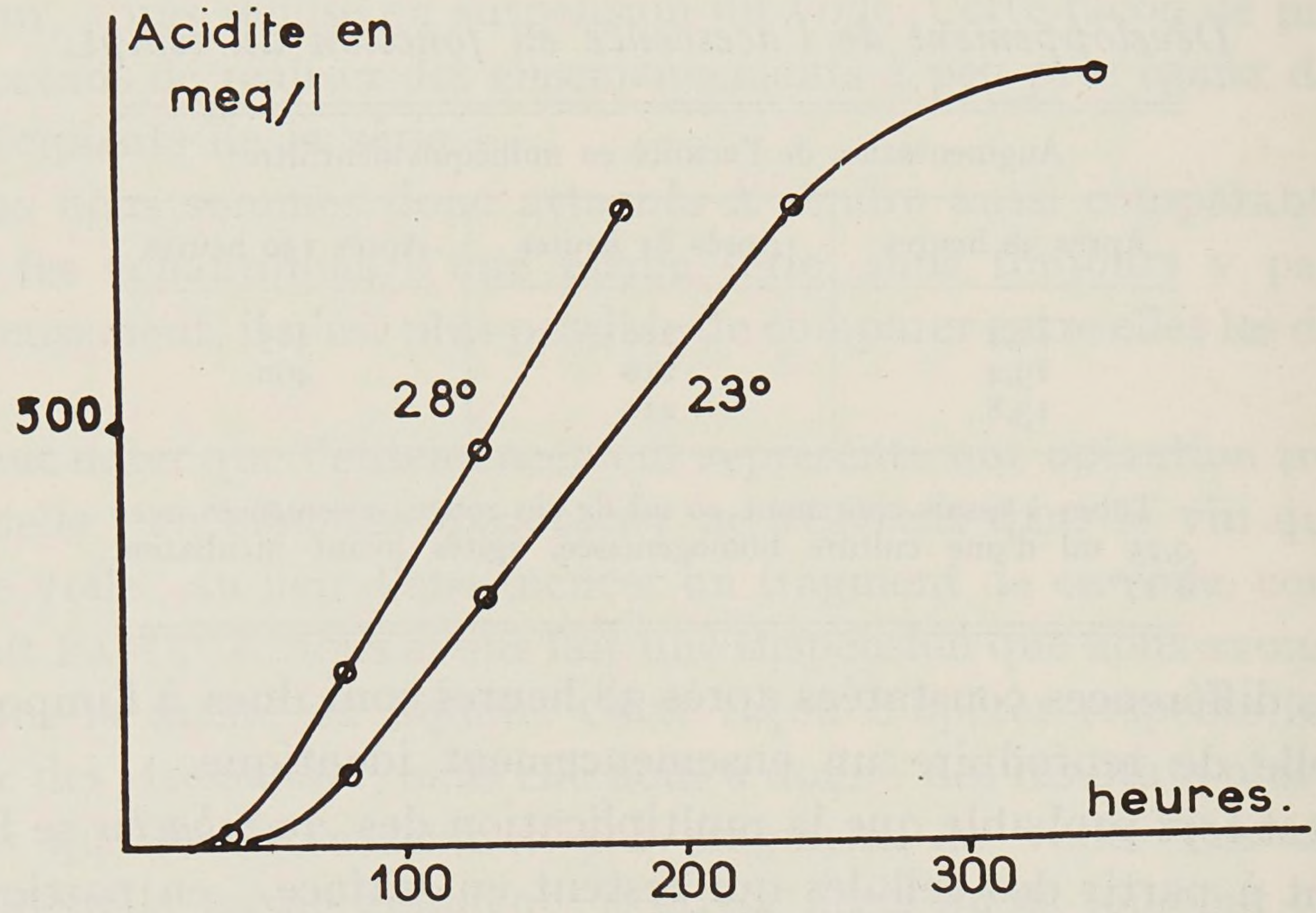
2. — Influence de la température.

Le graphique 1 montre que la température élevée accélère à la fois l'apparition du voile et la vitesse de production de l'acide acétique.

3. — Influence du pH.

L'observation a montré que l'acescence était extrêmement rare dans les vins acides. Elle est peu fréquente dans les vins des régions septentrionales, malgré leurs faibles degrés alcooliques. Elle est plus courante dans les vins méridionaux qui ne doivent leur résistance qu'à une teneur en alcool plus élevée.

Pour préciser l'influence de ce facteur sur le développement des *Acetobacter*, on a pris deux vins différents ramenés au même degré alcoo-



Graphique 1. — Influence de la température sur le développement d'*Acetobacter rancens*. Essais réalisés dans des tubes contenant 20 ml de vin rouge 8°2.

lique et dont le pH a été ajusté à diverses valeurs par addition de soude ou d'acide sulfurique (tableaux III et IV).

TABLEAU III

*Développement d'*Acetobacter rancens *en fonction du pH.*

N° des tubes	pH	Aspect après 2 jours	Acidité volatile en méq/l après 5 jours
1	2,83		9,6
2	2,83		9,6
3	3,08		10,2
4	3,08		10,2
5	3,23	voile	390
6	3,23	voile	335
7	3,40	voile	495
8	3,40	voile	470
9	3,76	voile	455
10	3,76	voile	360

Tubes à essais contenant 20 ml. de vin rouge — pH = 3,23. alcool = 8°2.

Ces expériences montrent que pour des vins très différents, de même degré, le pH qui permet le développement des *Acetobacter* est à peu près le même. Pour un vin de 8°2, ce pH limite peut être fixé approximativement à pH = 3.

Dans une expérience parallèle, on a ensemencé les mêmes tubes avec une culture pure de mycodermes. On a constaté après 5 jours d'incu-

bation, que les voiles étaient formés dans tous les tubes, même dans ceux dont le pH était trop bas pour permettre le développement des *Acetobacter*. Le pH limite pour les mycodermes est donc inférieur à celui

TABLEAU IV

*Développement d'*Acetobacter rancens *en fonction du pH.*

N° des tubes	pH	Aspect après 2 jours	Acidité volatile en méq/l après 5 jours 1/2
1	2,85		6,2
2	2,85		6,2
3	3,10		153
4	3,10		198
5	3,25	voile	415
6	3,25	voile	385
7	3,45	voile	435
8	3,45	voile	463
9	3,75	voile	475
10	3,75	voile	415

Tubes à essais contenant 20 ml. de vin rouge de 10°1 ramené à 8°2 par dilution pH = 3,10,

des *Acetobacter*. Ce fait est signalé aussi par GENEVOIS (2) qui écrit à ce sujet : « Dans les vins acides, de pH inférieur à 3,2, les bactéries acétiques ne se développeraient pas, le voile étant alors uniquement constitué par la fleur. »

4. — Influence de l'alcool.

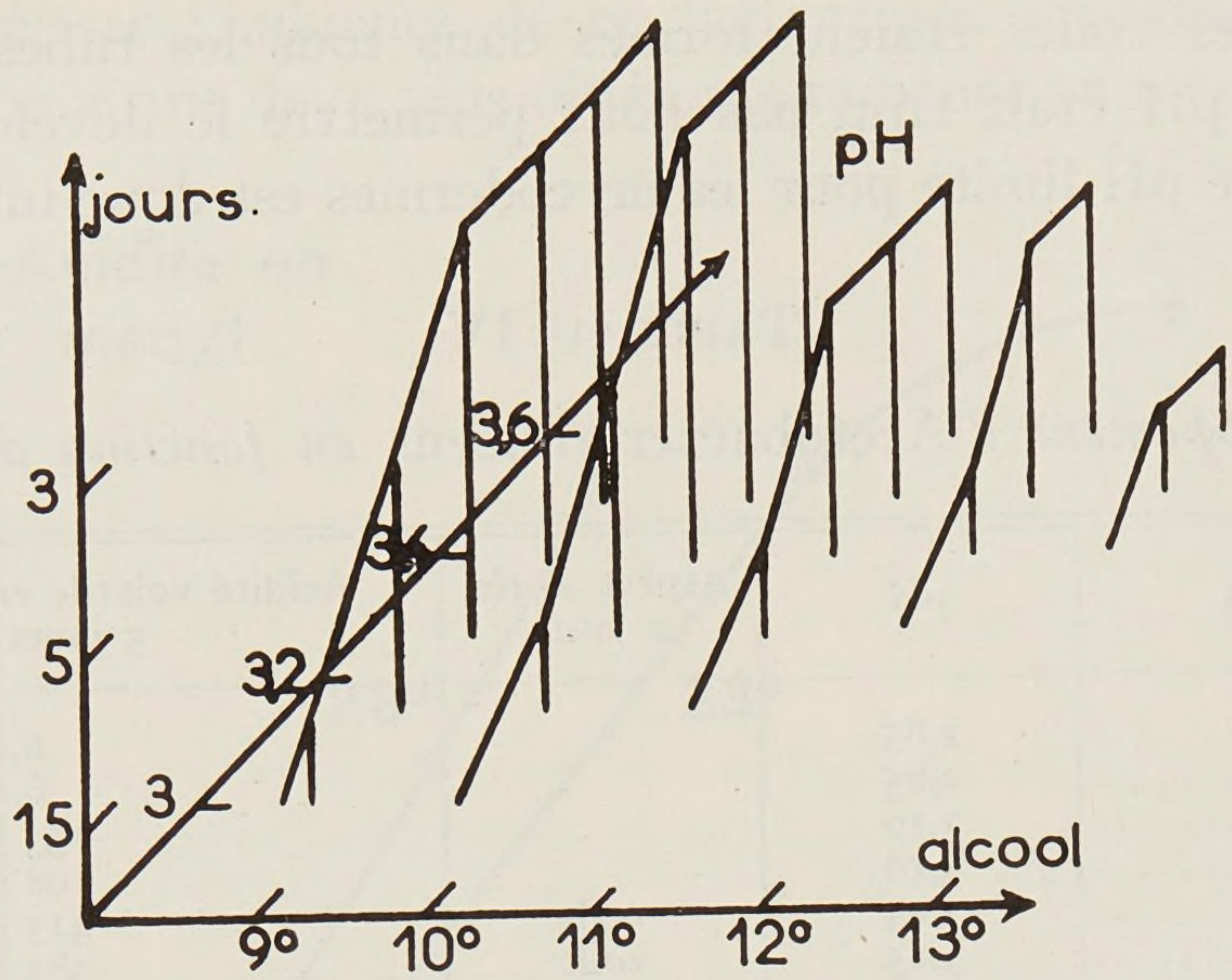
C'est un fait d'observation que les vins à degré alcoolique élevé se piquent rarement. Jusqu'ici il n'a pas été possible de déterminer une teneur alcoolique au-dessus de laquelle le vin devient impropre au développement des *Acetobacter*. Ceci est dû à ce que la toxicité de l'alcool est étroitement liée au pH du vin.

En vue de déterminer la part qui revient à ces deux facteurs, on a ajusté un vin rouge à divers pH et à divers degrés alcooliques. Après ensemencement et séjour à l'étuve à 28°, on a noté le nombre de jours qui s'écoulait avant l'apparition d'un voile d'*Acetobacter*. Chaque essai réalisé dans des tubes a été répété quatre fois.

Les résultats de cette expérience ont été réunis dans le graphique 2.

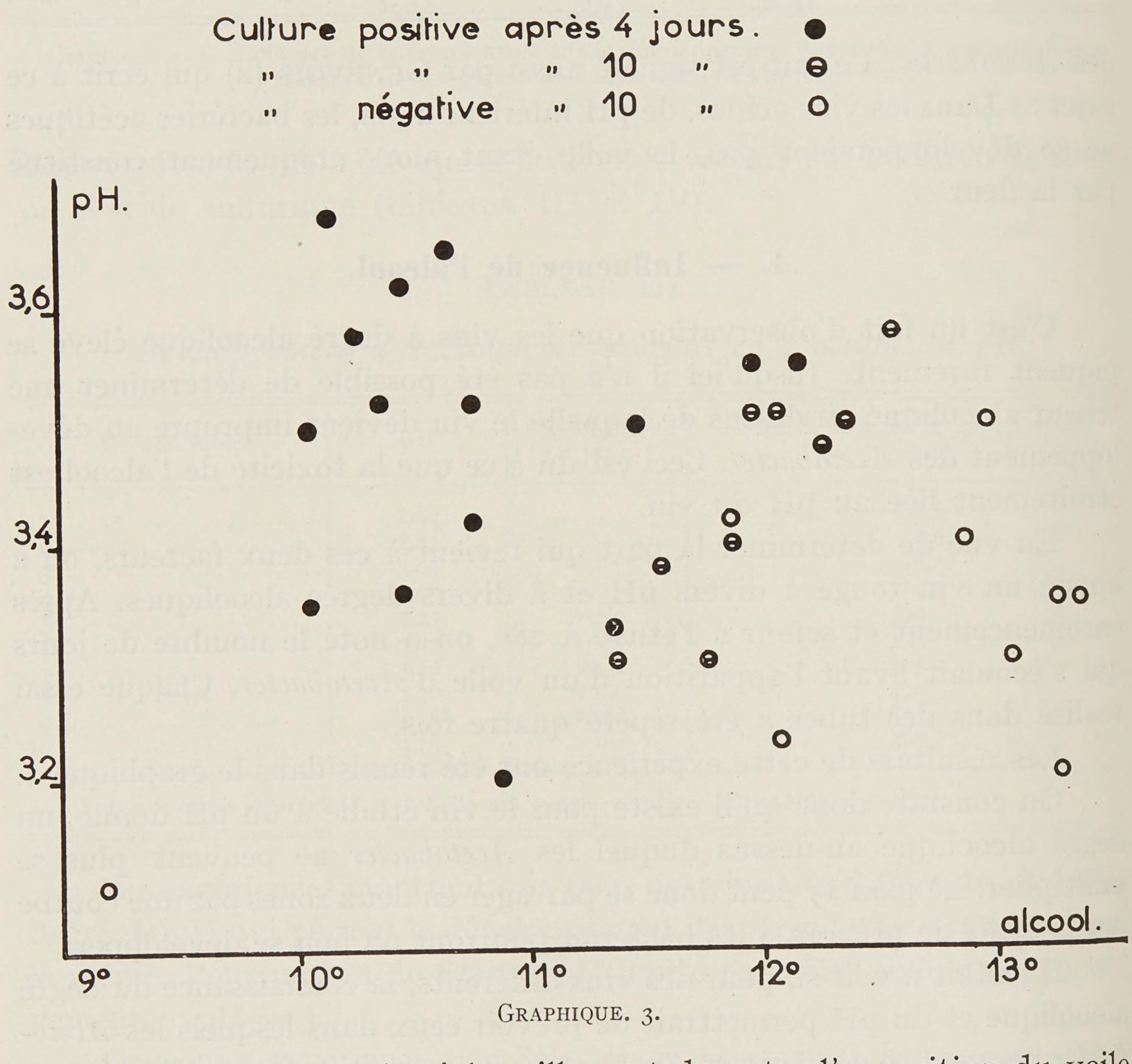
On constate donc qu'il existe pour le vin étudié à un pH donné, un degré alcoolique au-dessus duquel les *Acetobacter* ne peuvent plus se multiplier. Le plan *xy* peut donc se partager en deux zones par une courbe permettant de prévoir si les bactéries pourront ou non se développer.

Il restait à voir si, pour des vins différents, la connaissance du degré alcoolique et du pH permettrait de prévoir ceux dans lesquels les *Acetobacter* peuvent se développer. Les vins d'une même récolte et d'une même propriété n'ayant pas reçu d'addition d'anhydride sulfureux, il a été



Graphique 2. — Rapidité du développement d'*Acetobacter rancens* en fonction du pH et de la teneur en alcool.

Chaque échantillon est représenté dans le plan xy en fonction de son degré alcoolique et de son pH. On lui fait correspondre une valeur de z qui représente l'inverse du nombre de jours qui s'écoulent avant l'apparition du voile, c'est-à-dire l'aptitude que présente le vin à se piquer.

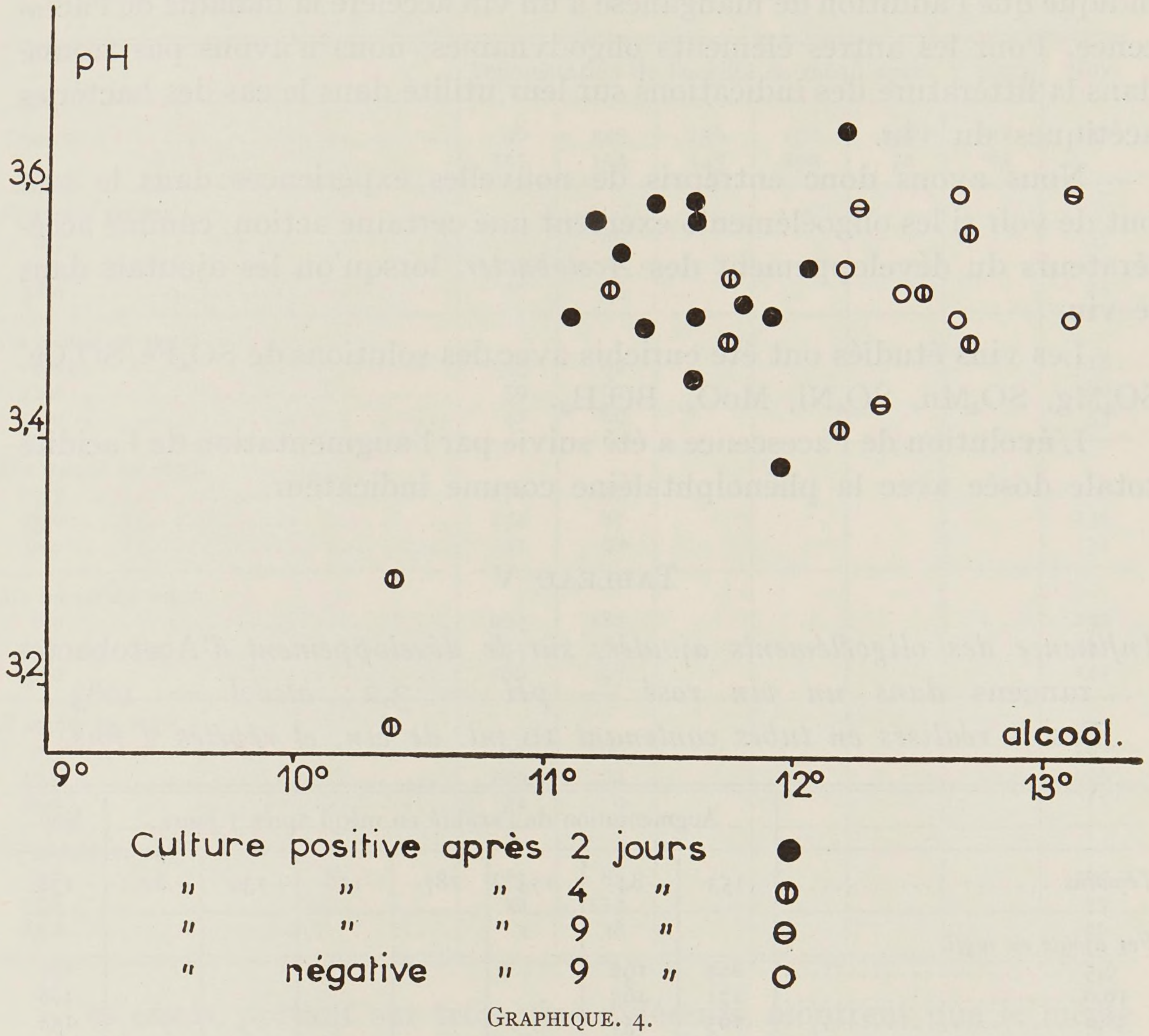


Graphique. 3.

possible d'ensemencer des échantillons et de noter l'apparition du voile à 28°. Les résultats représentés sur le graphique 3 permettent encore de

reconnaître dans le plan deux régions avec cependant quelques exceptions.

Mais il n'en est plus de même si on refait l'expérience avec des vins d'origine plus diverse, plus large : par exemple, des vins rouges des Corbières de la récolte 1952. Le graphique 4 ne laisse plus voir de délimitation entre les vins convenant et ceux ne convenant pas au développement des *Acetobacter*.



GRAPHIQUE. 4.

Graphiques 3 et 4. — Aptitude de divers vins au développement des *Acetobacter rancens* en fonction de leur pH et degré alcoolique.
Vins originaires d'une même propriété (graph. III)
Vins originaires d'une même région viticole (graph. IV).

En général, il ne sera donc pas possible par la seule connaissance du degré alcoolique et du pH de connaître la résistance que peut offrir un vin au développement des bactéries acétiques.

5. — Influence des oligoéléments.

Il a été reconnu que certains cations favorisent le développement des *Acetobacter* lorsqu'on les ajoute au milieu de culture. Les bactéries utilisées en vinaigrerie ne se montrent pas très exigeantes à ce point de vue,

puisque Hoyer (3) a reconnu qu'elles pouvaient pousser sur un milieu ne contenant du point de vue minéral que les 3 sels suivants :

SO_4Mg
$PO_4H(NH_4)_2$
PO_4H_2K

Bertrand et Sazerac (4) en 1913, ont montré l'action favorable du manganèse sur la fermentation acétique. En 1938, Flanzy (5) a indiqué que l'addition de manganèse à un vin accélère la maladie de l'acescence. Pour les autres éléments oligodynames, nous n'avons pas trouvé dans la littérature des indications sur leur utilité dans le cas des bactéries acétiques du vin.

Nous avons donc entrepris de nouvelles expériences dans le seul but de voir si les oligoéléments exercent une certaine action, comme accélérateurs du développement des *Acetobacter*, lorsqu'on les ajoutait dans le vin.

Les vins étudiés ont été enrichis avec des solutions de SO_4Fe, SO_4Cu, SO_4Mg, SO_4Mn, SO_4Ni, MoO_3, BO_3H_3.

L'évolution de l'acescence a été suivie par l'augmentation de l'acidité totale dosée avec la phénolphtaléine comme indicateur.

Tableau V

Influence des oligoéléments ajoutés, sur le développement d' Acetobacter rancens *dans un vin rosé — pH = 3,2 ; alcool = 10°3*
Essais réalisés en tubes contenant 10 ml. de vin, et répétés 2 fois.

	Augmentation de l'acidité en méq/l après 7 jours							Moy.
Témoins	153	84	174	187	136	139	82	136
Fer ajouté en mg/l.								
9,5	202	192						197
19,0	171	165						168
38,0	165	151						158
Cu ajouté en mg/l.								
6,0	165	104						135
12,0	35	22						28
24,0	8	14						11
Mn ajouté en mg/l.								
7,5	147	132						140
15,0	190	118						154
30,0	161	161						161

Dans une même expérience, des différences subsistent entre des échantillons ayant reçu les mêmes additions. L'expérience rapportée dans le tableau VII a été réalisée avec le maximum de soins. Les tubes ont été préalablement calibrés de façon à présenter le même rapport surface sur volume du liquide. Le nettoyage a été identique et très poussé, en évi-

tant toutefois l'emploi du mélange sulfochromique. Le vin a été ensemencé dans la masse avant d'être réparti, afin d'éviter les irrégularités d'ensemencement.

TABLEAU VI

*Influence des oligoéléments ajoutés, sur le développement d'*Acetobacter rancens *dans un vin rouge, alcool* = 9°8.
Essais réalisés en tubes contenant 10 *ml de vin, et répétés* 2 *fois.*

	Augmentation de l'acidité en méq/l après 7 jours						Moy.
Témoins	46	145	156	191	148	132	132
	107	153	145	199	74	83	
Fe ajouté en mg/l.							
9,5	28	46					37
19,0	5	22					14
38,0	18	25					21
Cu ajouté en mg/l.							
6,0	145	92					118
12,0	59	61					60
24,0	41	69					55
Mn ajouté en mg/l.							
7,5	171	46					108
15,0	174	87					130
30,0	41	92					71
Mo ajouté en mg/l.							
8,0	204	181					192
16,0	174	160					167
32,0	186	97					141
B ajouté en mg/l.							
8,3	97	109					103
16,6	109	102					105
33,2	22	0					11
Ni ajouté en mg/l.							
5,8	125	84					105
11,6	22	112					77
23,2	3	38					20

Ces essais, portant sur trois vins différents, montrent que le même élément peut être favorable dans un cas et indifférent ou toxique dans un autre.

Le Fer se montre une fois favorable, une fois toxique et une fois indifférent.

Le Manganèse présente par trois fois une faible efficacité pour la dose élevée de 5 mg/l.

Le Molybdène est favorable dans deux essais.

Le Cuivre, le Nickel et le Bore se montrent toxiques dans tous les essais.

Le vin constitue donc un milieu équilibré en oligoéléments, pour la croissance des bactéries acétiques. D'après nos expériences il n'est guère possible de modifier ses propriétés envers les *Acetobacter* par l'ad-

dition de l'un des oligoéléments que l'on y rencontre naturellement. Les variations de concentration des divers cations, dans les limites naturelles, influent donc peu sur la vitesse de développement de ces bactéries dans le vin.

TABLEAU VII

*Influence des oligoéléments ajoutés, sur le développement d'*Acetobacter rancens *dans un vin blanc. Alcool* = 11°.
Essais réalisés dans des tubes calibrés, contenant 10 *ml de vin, et répétés* 4 *fois.*

	Augmentation de l'acidité en méq/l. après 4 jours								Moy.
Témoins	184	174	194	(3)	(5)	153	(o)	184	
	209	210	235	199	245	275	199	225	212
	189	204	265	189	220	235	312	230	
Fe ajouté en mg/l.									
9,5	204	194		158		143			175
19,0	153	168		179		194			174
38,0	54	174		97		102			122
Cu ajouté en mg/l.									
6,0	158	122		189		(o)			156
12,0	163	174		138		184			164
24,0	158	184		168		209			180
Mn ajouté en mg/l.									
7,5	230	189		204		184			201
15,0	(5)	271		250		245			255
30,0	220	199		265		199			220
Mo ajouté en mg/l.									
8,0	250	225		245		153			221
16,0	225	235		245		245			237
32,0	250	225		230		235			235
B ajouté en mg/l.									
8,3	174	153		204		158			172
16,6	209	204		209		153			194
33,2	66	128		87		87			92
Ni ajouté en mg/l.									
5,8	117	174		158		112			165
11,6	133	184		215		179			179
23,2	92	112		148		41			98

Une étude plus précise de l'influence des oligoéléments devrait s'affranchir des irrégularités de culture ; il faudrait peut-être adopter la culture sur milieu agité. Les renseignements tirés de telles expériences ne pourraient pas raisonnablement être appliqués au problème qui nous préoccupe qui, lui, fait intervenir le développement du voile en surface. C'est la raison pour laquelle nous n'avons pas entrepris une telle expérimentation.

Cette expérimentation n'a pas tenu compte des oligoéléments qui sont déjà présents dans le vin. Nous avons donc cherché à appauvrir le milieu en certains de ces éléments.

On a utilisé pour cela deux réactifs : le phytate de sodium qui enlève

uniquement le fer et le ferrocyanure de potassium qui, outre le fer, enlève le manganèse, le cuivre, le zinc et des protéines.

Des expériences récentes rapportées par M. FLANZY (6) ont montré que des vins correctement traités au ferrocyanure, c'est-à-dire sans qu'il existe un excès de ce produit, ne permettent plus le développement des *Acetobacter*.

Cette expérience pouvait s'expliquer par l'élimination d'un oligoélément indispensable ou par la formation d'un composé toxique. Cette dernière hypothèse n'est pas à rejeter à priori, si on songe que les *Acetobacter* sont extrêmement sensibles à l'acide cyanhydrique. En effet, QUERE (7) a pu montrer qu'à la concentration de N/60 000 en acide cyanhydrique, la croissance d'une bactérie acétique est entièrement arrêtée dans un milieu minéral de pH = 4,7. Cette concentration extrêmement faible représente 0,45 mg/l de CNH. Comme les doses de ferrocyanure employées pour le traitement des vins peuvent atteindre et dépasser 100 mg/l, on conçoit alors qu'une certaine quantité de cyanure, qui est peut-être présente dans un produit impur, suffise à inhiber la croissance des bactéries acétiques.

a) **Traitement au ferrocyanure.**

Le traitement au ferrocyanure a été effectué suivant la technique recommandée par RIBEREAU-GAYON (8) pour les essais. Le vin choisi avait une teneur en fer normale. Nous avons disposé, après traitement, de 5 échantillons : le premier, qui a servi de témoin, a reçu une addition d'eau égale au volume de ferrocyanure ajouté ; il a subi un collage à la gélatine comme les autres échantillons. Le deuxième échantillon a reçu 50 mg/l de ferrocyanure R.P. — on a vérifié qu'il n'y avait pas d'excès. Les échantillons suivants ont tous présenté un excès de ferrocyanure — Ils en avaient reçu respectivement 75, 100, 125 mg/l.

Chaque échantillon a été réparti, à raison de 10 ml, dans 4 tubes à essais, pasteurisés à 80° et ensemencés avec une culture de 3 jours mise en suspension dans l'eau. Le développement s'est produit de la façon suivante :

Un excès de ferrocyanure dans le vin produit un retard dans le développement du voile et l'acétification. Un excès de l'ordre de 50 mg/l arrête même toute croissance microbienne. On remarque aussi que le vin conservé en présence d'un excès de ferrocyanure devient plus toxique pour les *Acetobacter*. Ainsi l'échantillon 4 permet leur développement immédiatement après le traitement et ne le permet plus après un mois de conservation. Ce fait laisse penser que le ferrocyanure ajouté en excès dans le vin, participe à des réactions lentes, qui conduisent à des composés pourvus d'une toxicité certaine envers ces microbes.

TABLEAU VIII

*Influence du traitement au ferrocyanure sur le développement d'*Acetobacter rancens.

Echantillons	Ferrocyanure de K ajouté en mg/l	Immédiatement après traitement : Apparition du voile après						Augmen. moy. ac. totale en méq/l. après 23 jours
		4 jours	6 jours	9 jours	11 jours	14 jours	17 jours	
1	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—
2	50	++	++++	++++	++++	++++	++++	625
3	75 (1)		+	++	++++	++++	++++	243
4	100 (1)						++++	116
5	125 (1)							0

Echantillons	Ferrocyanure de K ajouté en mg/l	Un mois après traitement : Apparition du voile après					
		4 jours	6 jours	10 jours	14 jours	20 jours	
1	0	++++	++++	++++	++++	++++	
2	50	+	++	++++	++++	++++	
3	75 (1)			++++	++++	++++	
4	100 (1)						
5	125 (1)						

(1) Excès de ferrocyanure.

Cette expérience, purement biologique, vient confirmer les conclusions que SALVARREZA (9) puis NEGRE et CORDONNIER (10) adoptaient à la suite d'une étude chimique sur le ferrocyanure.

Un vin correctement traité au ferrocyanure, continue à permettre le développement des bactéries acétiques. Il se montre cependant un peu moins favorable que le témoin, mais on ne peut invoquer parmi les avantages du collage bleu, le fait qu'il empêche la maladie de l'acescence.

b) **Traitement au phytate.**

Un vin blanc, pauvre en fer, 5 mg/l, est traité au phytate de calcium et sa richesse en fer est ainsi abaissée à 0,8 mg/l. Après avoir séparé le précipité, le vin est ensemencé, puis réparti dans des tubes calibrés et additionné de solutions contenant du Fer et du Manganèse. Les résultats sont réunis dans le tableau IX.

D'après cette expérience, ni l'addition de fer, ni celle de manganèse ne paraissent augmenter la vitesse d'acétification du vin considéré. Le traitement au phytate, bien qu'il abaisse la teneur en fer des vins, ne les rend pas plus résistants au développement des *Acetobacter*.

TABLEAU IX

*Influence du traitement au phytate de calcium sur le développement d'*Acetobacter rancens.

Vin blanc pH = 3,2 *Alcool* = 8°.

	Augmentation de l'acidité en méq/l. après 6 jours			Moyenne
Témoins	455 408	440 414	460 388	425
Fe ajouté en mg/l.				
4,75	350	316	363	343
9,50	392	384	374	384
19,00	326	310	308	314
Mn ajouté en mg/l.				
3,75	445	450	424	440
7,50	432	408	408	416
15,00	428	428	418	424

6. — Influence des tanins.

Les tanins du vin sont un mélange de composés polyphénoliques assez mal définis du point de vue chimique. Dans nos expériences, nous avons ajouté à du vin un tanin extrait des sous-produits de la vinification. Cette poudre (Tanins New Mark'), préparée industriellement par extraction à l'éther, constitue un mélange non pas identique, mais de même origine que le tanin du vin.

Deux vins très différents ont été choisis pour faire cet essai : l'un jeune et chargé en tanin, l'autre vieux et pauvre en tanin. Avant l'expérience, les tanins ont été dosés après précipitation, par oxydation permanganique, selon la méthode de NEGRE (11).

Les résultats sont exprimés en œnotanin comme l'indique cet auteur. Les expériences ont été conduites dans des fioles pyrex identiques de 1 litre contenant 350 ml de liquide. L'acidité volatile a été dosée après des temps différents en prenant soin de ne pas abîmer le voile lors des prélèvements.

Ces deux expériences (tableau X) ont permis de constater que le tanin de raisin possède une action défavorable sur l'acescence. Il ne l'empêche pas, mais la retarde seulement aux doses utilisées. Des doses plus fortes ne peuvent être employées par suite du peu de solubilité de ces substances tannoïdes. On doit d'ailleurs considérer que les doses ajoutées sont déjà très élevées et donnent au vin une astringeance désagréable au goût. Si l'on compare les essais 5 et 2 qui diffèrent surtout par le degré alcoolique et le pH, on voit que le tanin n'a pas retardé le développement de la maladie dans le vin où le pH était très favorable. Par contre, la

même dose d'œnotanin apparaît plus inhibitrice dans l'essai nº 5 où le vin employé se trouve au voisinage du pH limite permettant la croissance.

TABLEAU X

Influence de l'addition de tanin sur le développement d' Acetobacter rancens.

Essai	Tanin ajouté en g/l	Œnotanin dosé en g/l	Acidité volatile en méq/l après : 8 jours	12 jours	18 jours
	I. Vin jeune, 9°40 ; pH = 3,3. A. V. 14 méq/l				
1	0	1,25	pas de voile	50	165
2	1,5	2,10	» »	52	230
3	3	2,90	» »	15	82
	II. Vin vieux, 7°20 ; pH = 3,04. A. V. 12 méq/l				
4	0	0,42	102	215	416
5	3	2,10	pas de voile	12	51

Au cours de l'acétification du vin, les tanins subissent des modifications qui ont été étudiées par NEGRE (12). La libération d'acétaldéhyde qui se produit alors a pour conséquence leur insolubilisation. Il semble que ce phénomène se produise surtout dans le voile. En effet, nous avons remarqué dans nos expériences que les vins enrichis en tanins produisaient des voiles plus tenaces qui ne montraient aucune tendance à s'effriter et à tomber au fond du tube comme dans les témoins. Cette constatation avait été faite depuis longtemps par les vinaigriers.

7. — Influence de la durée de macération du vin.

A côté des tanins qui enrichissent le vin au cours de la macération, d'autres corps diffusent aussi, en particulier d'autres polyphénols. Nous avons recherché si tous ces constituants qui contribuent à faire l'originalité des vins rouges par rapport aux vins blancs, ne sont pas susceptibles d'exercer une influence sur le développement des *Acetobacter*.

Nous avons disposé pour notre expérience de deux vins provenant du même raisin ; l'un a été obtenu en faisant fermenter le jus de goutte, vin rosé et l'autre en réalisant la fermentation en présence des éléments solides, vin rouge. Les deux vins différaient considérablement par le degré alcoolique. La macération avec les rafles avait produit dans ce cas-là, un enrichissement en eau particulièrement élevé. Il a donc fallu avant l'expérience, diluer le vin rosé de façon à ramener son degré alcoolique de 12°37 à 10°91, degré du vin rouge. Les pH, par contre, étaient très voisins : 3,27 pour le rosé ; 3,3 pour le rouge.

Les deux échantillons après stérilisation et ensemencement, ont été répartis à raison de 10 ml dans des tubes calibrés.

TABLEAU XI

*Développement d'*Acetobacter rancens *dans un vin rosé et un vin rouge provenant du même cépage.*

Temps en jours	Augmentation de l'acidité totale en méq/litre			
	Vin rouge	Moyenne	Vin rosé	Moyenne
4	72-82-92-97-66	82	49-61-122-168-189	118
7	376-376-490-506-510	452	610-715-720-765-830	730

On trouve que le vin de macération est un peu plus résistant à l'acescence que le vin préparé sans macération. Cette différence est faible et ne suffit pas à conditionner l'inaltérabilité d'un vin.

8. — Influence de l'addition de glucose et de glycérine.

Le glucose et la glycérine peuvent constituer pour les *Acetobacter* des aliments énergétiques très intéressants. Ainsi BAETSLE (13) a montré tout l'intérêt qu'il y avait à maintenir présent dans le moût à acétifier une teneur en glucose d'au moins 0,1 g/l. La glycérine étant présente dans les vins à une concentration très appréciable de l'ordre de 5 g par litre, il nous a paru utile de rechercher l'influence de ce composé. Deux expériences sont rapportées par les tableaux XII et XIII.

TABLEAU XII

*Influence de l'addition de glucose ou de glycérine sur le développement d'*Acetobacter rancens.

Essais réalisés dans des fioles cylindro-coniques de 250 *ml contenant* 50 *ml de vin rouge.*

Glucose ajouté en g/l	0	0,4	0,8	1,6	3,2	6,4
Augmentation de l'acidité totale en méq/litre après 3 jours	370	378	345	400	368	327
Glycérine ajoutée en g/l	0	0,4	0,8	1,6	3,2	6,4
Augmentation de l'acidité totale en méq/litre après 3 jours	345	362	382	358	310	354

TABLEAU XIII

*Influence de l'addition de glucose ou de glycérine sur le développement d'*Acetobacter rancens.

Essais réalisés dans des tubes calibrés contenant 10 *ml de vin blanc.*

Glucose ajouté en g/l.	Augmentation de l'acidité totale en méq/l après 2 jours	Moyenne
0	128 — 128 — 192 — 132 — 138 — 158	136
1,9	83 — 112 — 138 — 138 — 138 — 138	128
3,8	128 — 143 — 148 — 153 — 153 — 153	146
Glycérine ajoutée en g/l.		
1,9	118 — 122 — 122 — 138 — 138 — 148	131
3,8	122 — 138 — 143 — 148 — 153 — 158	144

L'addition de glucose et de glycérine influe très peu sur le développement de l'acescence. Le vin constitue un milieu suffisamment riche en aliments hydrocarbonés pour qu'une nouvelle addition de l'un de ces deux produits ne le rende pas plus favorable aux ferments acétiques.

CONCLUSION

Le développement des *Acetobacter* nécessite le libre accès de l'air à la surface du vin. Ce point a été suffisamment établi aussi bien par les travaux de PASTEUR que par l'observation de la pratique. Cette condition indispensable étant réalisée, l'aptitude que présente un vin à prendre l'acescence dépend de deux facteurs primordiaux : le pH et le degré alcoolique. Les résultats obtenus à la suite de cette étude permettent de prévoir en fonction de ces deux facteurs, si un vin donné, ensemencé avec la souche utilisée, se piquera ou restera sain. On remarque, à la suite des exemples rapportés, que la plupart des vins récoltés dans les régions méridionales sont favorables au développement des *Acetobacter*. On ne peut donc les protéger de cette altération qu'en empêchant l'accès de l'air ou en utilisant l'anhydride sulfureux qui est un antiseptique particulièrement efficace envers ces bactéries.

Les autres facteurs, dans les limites où ils sont susceptibles de varier dans les vins, interviennent beaucoup moins et n'influencent que sur la vitesse de développement des *Acetobacter*. Sont dans ce cas, la présence de sucre ou de glycérine, l'addition de tanin, l'élimination ou l'addition d'oligoéléments.

Reçu pour publication le 12 mars 1957.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) DUPUY (P.). — Les acetobacter du vin. Identification de quelques souches. *Ann. de l'I. N. R. A., série E, Ann. de Techn.* **6**, 217-233, 1957.
(2) GENEVOIS (L.) et RIBEREAU-GAYON (J.). — Le vin. Hermann, Paris, 1947.
(3) HOYER (D.). — Bijdrage tot de Kennis van de Azijnbacterien. Dissertation Delft, 1898.
(4) BERTRAND (G.) et SAZERAC (R.). — Activation de la fermentation acétique par les sels de Mn. *C. R. Ac.*, **157**, 149, 1913.
(5) FLANZY (M.). — Observations sur le manganèse en œnologie. *C. R. Ac. Agr. Fr.*, **24**, 319-325, 1938.
(6) FLANZY (M.). — Le ferrocyanure de potassium et l'élimination du fer en œnologie. *C. R. Ac. Agr. Fr.*, **38**, 575-579, 1952.
(7) QUERE (H.). — Recherches sur la croissance et le métabolisme d'une bactérie acétique. Thèse — J. Bière, éditeur, Bordeaux, 1935.
(8) RIBEREAU-GAYON (J.). — Traité d'Œnologie. Librairie polytechnique, Paris, 1947.
(9) SALVAREZZA (M.). — Clarification des vins par le ferrocyanure de potassium. *Ann. Chim. Appl.*, **24**, 9, 1934.

(10) Negre (E.) et Cordonnier (R.). — Ferrocyanure de potassium et phytate de calcium. *C. R. Ac. Agr. Fr.*, **38**, 346-49, 1952.

(11) Negre (E.). — Contribution à l'étude des matières tannoïdes du vin. Thèse — Strasbourg, 1945.

(12) Negre (E.). — Les matières tannoïdes et la composition des vins. B. O. I. V., n° 154, 20-52, 1942. — n° 155, 25-56, 1943.

(13) Baetsle (R.). — Recherches sur la fermentation acétique industrielle. *Bull. Techn. Vinaigrerie*, n° 8, 248-53, 1951-53.

MISE EN ÉVIDENCE D'UNE FIXATION DE LA NISINE SUR LES CELLULES D'UNE BACTÉRIE THERMOPHILE UTILISÉE POUR LE DOSAGE DE CET ANTIBIOTIQUE

PAR

P. RAIBAUD

Station centrale de Microbiologie et Recherches laitières, Jouy-en-Josas.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

II. — Matériel et méthodes.

III. — Résultats.

Mise en évidence d'une perte d'activité du sérum-nisine :

1° Après contact avec les cellules de *T. tarbellicus*.

2° Après contact avec les cellules lavées, chauffées et soumises à une incubation prolongée.

3° Influence du temps de contact.

IV. — Discussion.

Hirsch et Mattick (1) ont montré que la nisine, polypeptide antibiotique produit par certaines souches de *Streptococcus lactis*, exerçait sur divers microbes un effet bactéricide, comparable à celui des désinfectants phénoliques. Hirsch (2) attribue cet effet bactéricide à une adsorption préliminaire de la nisine sur les membranes cellulaires, puis à la formation d'un complexe entre l'antibiotique et un métabolite essentiel à la bactérie dont la nature exacte n'est pas connue.

D'autre part, Newton (3, 4, 5) et Few (6, 7) ont montré que la polymyxine, autre polypeptide antibiotique, se fixait sur les membranes cellulaires en formant un complexe soit avec les polyphosphates soit avec les lipides de la membrane. Cette fixation est accompagnée d'une libération dans le milieu de substances absorbantes à 260 mμ. En outre ces auteurs ont montré que la fixation a lieu uniquement sur les cellules microbiennes sensibles à l'antibiotique ; ils n'ont pu mettre en évidence aucune fixation sur les cellules résistantes.

Cette constatation présente un intérêt considérable puisqu'elle permet d'envisager une méthode rapide, simple et spécifique pour déter-

miner le comportement d'une bactérie vis-à-vis de l'antibiotique. Or dans le cas de la nisine, la distinction rapide entre souches sensibles et souches résistantes à cet antibiotique représente un problème important en technologie laitière.

Le présent travail a pour objet l'étude de la fixation de la nisine sur les cellules d'une bactérie thermophile, *Thermobacillus tarbellicus*, dont nous avons déjà montré (1) la grande sensibilité à l'égard de la nisine, et que nous avons utilisée pour un dosage rapide de cet antibiotique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Source de nisine

Dans tous nos essais, nous avons utilisé comme source de nisine un lactosérum obtenu à partir d'une culture sur lait de *Streptococcus lactis*, souche X 13. La culture est portée rapidement à l'ébullition, selon la technique de Berridge (9), puis centrifugée : le lactosérum surnageant contient la nisine : nous l'appellerons, dans la suite du texte, le sérum-nisine.

Mode opératoire

Pour étudier le comportement des cellules bactériennes vis-à-vis de la nisine nous avons adopté le mode opératoire suivant : on centrifuge un volume déterminé d'une culture de *T. tarbellicus* parvenue en fin de croissance logarithmique, et le culot de centrifugation est mis en suspension dans un volume plus faible de tampon phosphate $\frac{M}{100}$ à pH 6,4. Nous avons utilisé deux types de suspensions concentrées : l'une, que nous appellerons suspension S 1, est concentrée 20 fois, l'autre, que nous appellerons suspension S 2, est concentrée 40 fois.

Dans un tube à essai E on introduit 4,9 ml de suspension S 1 ou S 2, puis 0,1 ml de sérum-nisine, et on maintient ce tube E à 68°C pendant 10 minutes. On prépare en même temps deux tubes témoins : l'un, T 1, reçoit le sérum-nisine, mais la suspension bactérienne est remplacée par le même volume de tampon ; l'autre, T 2, reçoit la même suspension que le tube E mais on ne lui ajoute pas de sérum-nisine. En dosant la nisine dans le tube E et dans le tube T 1, après élimination des cellules bactériennes par centrifugation, on peut évaluer la quantité de nisine qui a disparu après contact avec ces cellules. Le tube T 2, après centrifugation et dilution du surnageant comme pour les tubes E et T 1, permet d'étudier l'influence du chauffage des bactéries, à 68°C pendant 10 minutes, sur la croissance de l'organisme utilisé pour les dosages de nisine.

Ces dosages de nisine sont effectués selon la technique que nous avons décrite en détail dans un autre travail (8).

RÉSULTATS

1° Mise en évidence d'une perte d'activité du sérum-nisine après contact avec les cellules de *T. tarbellicus*.

Premier essai (fig. 1) :

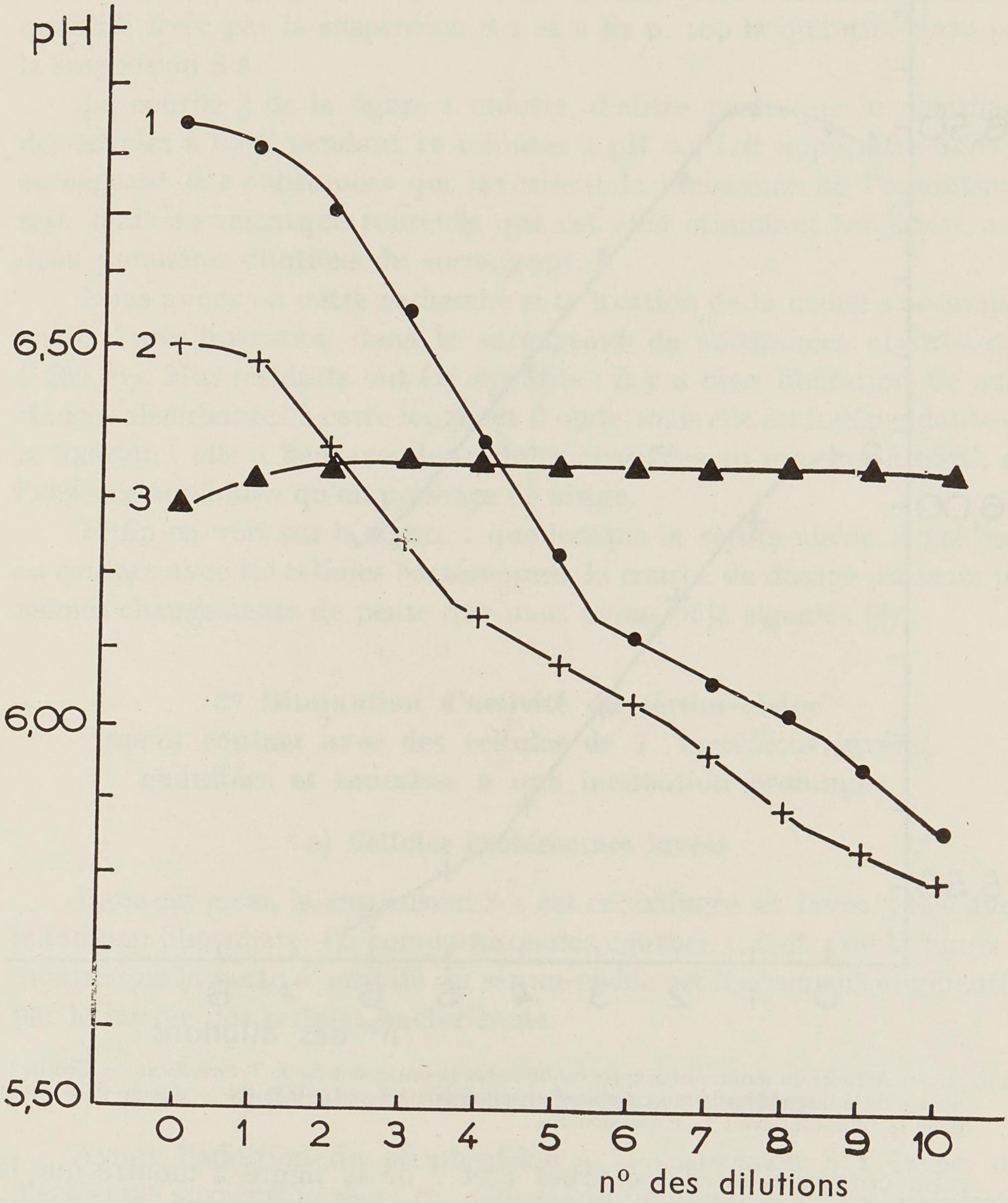


FIG. 1. — Activité du sérum-nisine après contact avec la suspension S1 de *T. tarbellicus*. — Courbe 1 : dosage de la nisine dans le tube témoin sans cellule bactérienne. — Courbe 2 : dosage de la nisine dans le tube contenant la suspension S1. — Courbe 3 : action du chauffage à 68°C pendant 10 min. des cellules de *T. tarbellicus* sur la croissance de l'organisme-test.

La comparaison des courbes 1 et 2 de la figure 1 met en évidence une diminution notable de l'activité antibiotique du sérum-nisine après contact avec la suspension S 1.

Deuxième essai (fig. 2) :

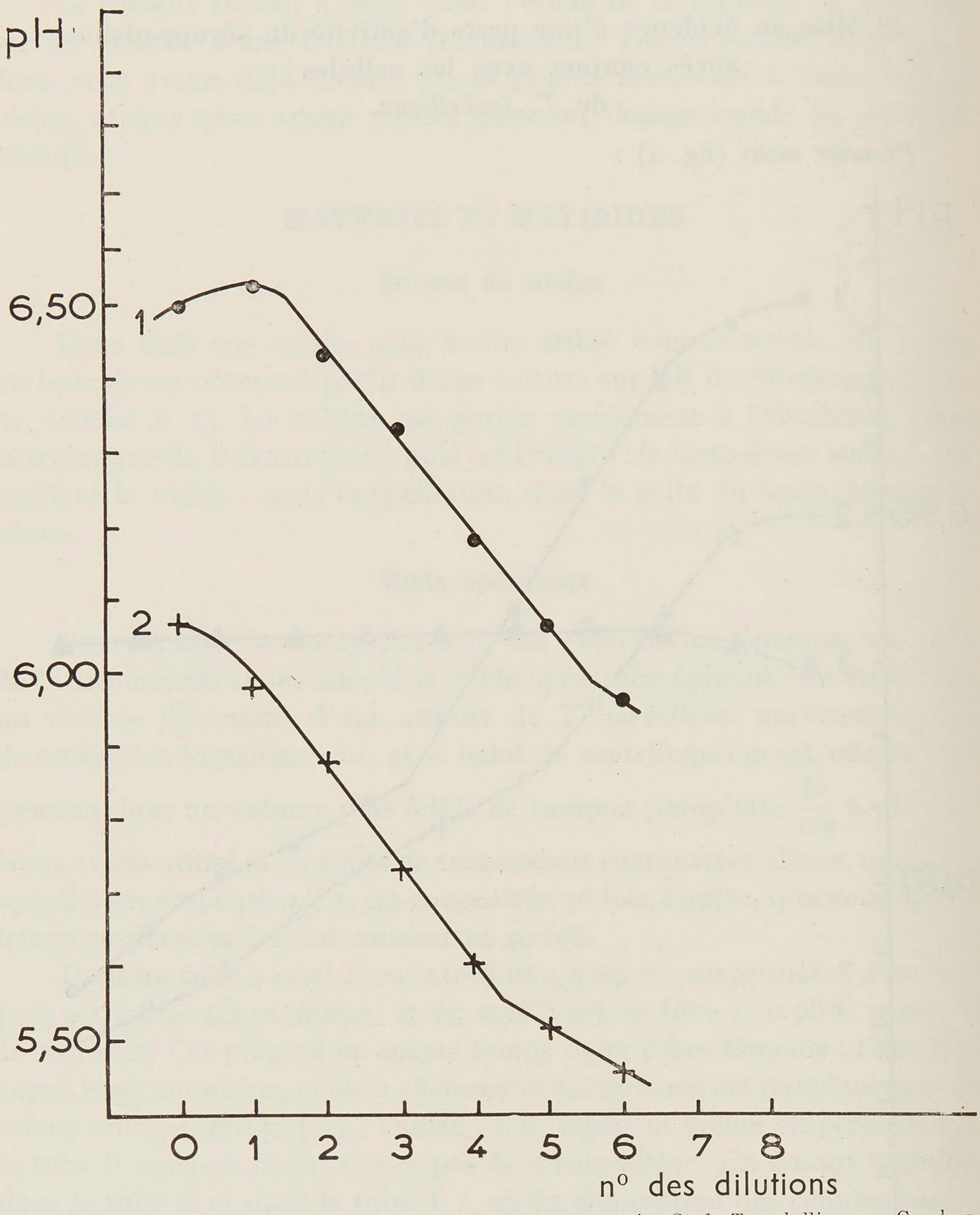


FIG. 2. — Activité du sérum-nisine après contact avec la suspension S2 de *T. tarbellicus*. — Courbe 1 : dosage de la nisine dans le tube témoin sans cellule bactérienne. — Courbe 2 : dosage de la nisine dans le tube contenant la suspension S2.

La comparaison des courbes 1 et 2 de la figure 2 montre que la perte d'activité du sérum-nisine après contact avec la suspension S 2 est nettement plus importante que dans l'essai précédent, après contact avec la suspension S 1.

Nous avons vu que la suspension S 2 est deux fois plus concentrée que la suspension S 1. La perte d'activité du sérum-nisine est-elle proportionnelle à la concentration des suspensions dans lesquelles il a été dilué ?

Si l'on tient compte du rapport $\frac{2}{3}$ existant entre les dilutions successives et du décalage existant entre les courbes 1 et 2 des figures 1 et 2 pour une même valeur du pH, on peut calculer le pourcentage de nisine fixée par les deux suspensions S 1 et S 2. Dans le premier essai on peut ainsi évaluer à 55 p. 100 de la nisine présente dans le sérum-nisine la quantité fixée par la suspension S 1 et à 87 p. 100 la quantité fixée par la suspension S 2.

La courbe 3 de la figure 1 montre, d'autre part, que le chauffage des cellules à 68°C pendant 10 minutes à pH 6,4 fait apparaître dans le surnageant des substances qui favorisent la croissance de l'organisme-test, mais on remarque toutefois que cet effet stimulant est limité aux deux premières dilutions du surnageant.

Nous avons en outre recherché si la fixation de la nisine s'accompagnait d'une libération dans le surnageant de substances absorbantes à 260 mμ. Nos résultats ont été négatifs : il y a bien libération de substances absorbantes à cette longueur d'onde, mais elle est indépendante de la fixation : elle a lieu avec les cellules chauffées 10 minutes à 68°C, en l'absence aussi bien qu'en présence de nisine.

Enfin on voit sur la figure 1 que lorsque le sérum-nisine a été mis en contact avec les cellules bactériennes, la courbe de dosage présente les mêmes changements de pente que nous avons déjà signalés (8).

2° Diminution d'activité du sérum-nisine après contact avec des cellules de *T. tarbellicus* lavées, chauffées et soumises à une incubation prolongée.

a) Cellules bactériennes lavées

Dans cet essai, la suspension S 1 est centrifugée et lavée 3 fois avec le tampon phosphate. La comparaison des courbes 1, 2 et 3 de la figure 3 montre que la perte d'activité du sérum-nisine est légèrement augmentée par le lavage des cellules bactériennes.

b) Cellules bactériennes lavées et chauffées

Avant l'addition du sérum-nisine à la suspension S 1 lavée, on place cette suspension dans un bain-marie bouillant et on l'y maintient 10 minutes. Une autre suspension S 1 lavée, qui ne subit pas le chauffage au bain-marie, sert de témoin pour la fixation de la nisine sur les cellules bactériennes.

La comparaison des courbes 1, 2 et 3 de la figure 4 montre que la diminution d'activité du sérum-nisine après contact avec les cellules chauffées est aussi importante que celle constatée avec les cellules non

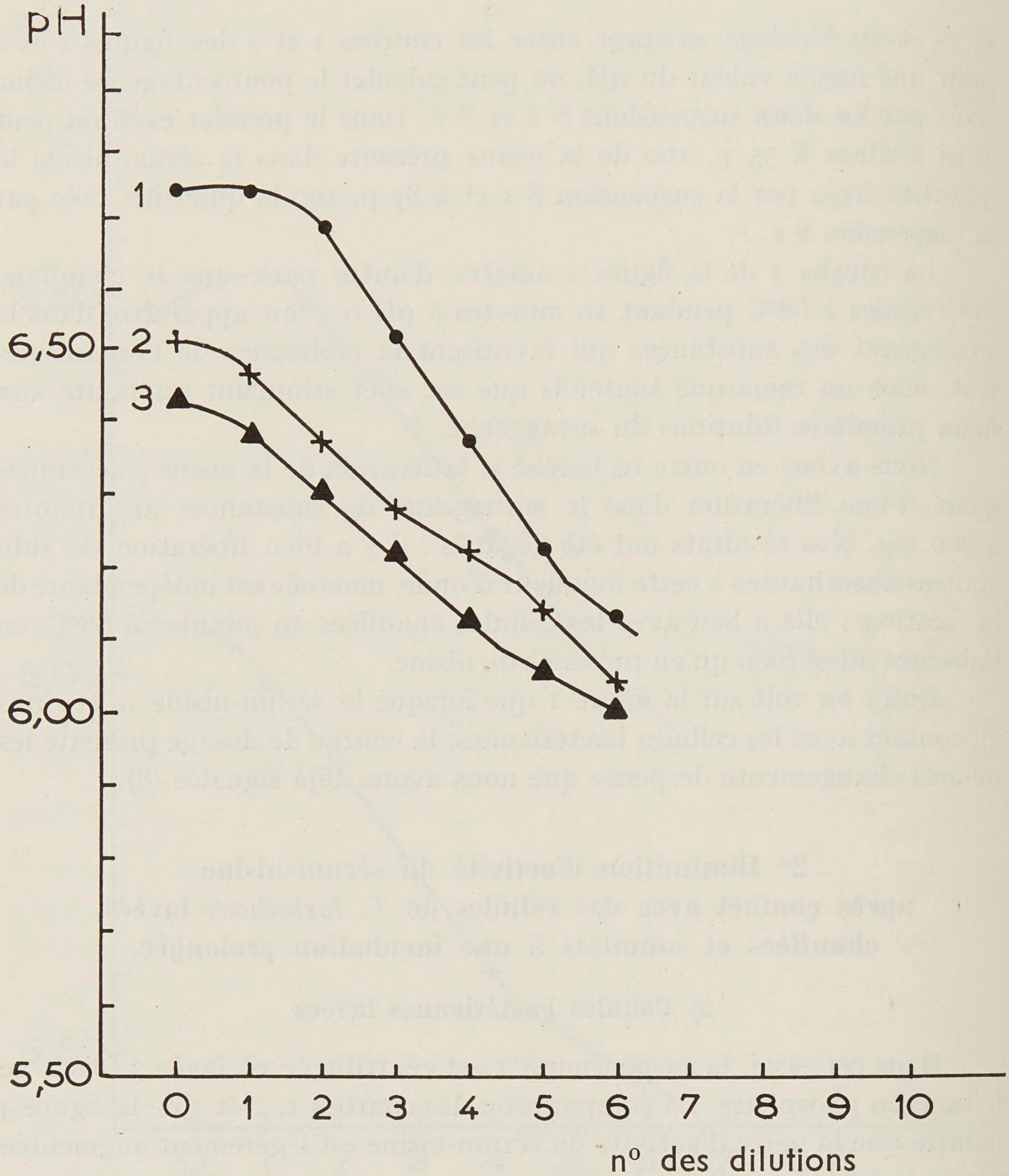


FIG. 3. — Activité du sérum-nisine après contact avec la suspension S1 lavée de *T. tarbellicus.* — Courbe 1 : dosage de la nisine dans le tube témoin sans cellule bactérienne. — Courbe 2 : dosage de la nisine dans le tube contenant la suspension S1 non lavée. — Courbe 3 : dosage de la nisine dans le tube contenant la suspension S1 lavée.

chauffées. La différence observée entre les courbes 2 et 3 pour les premières dilutions est sans doute due à la présence de substances activantes qui résultent du chauffage à 100°C et déjà signalées plus haut pour un chauffage à 68°C ; si l'on compare la courbe 3 de la figure 1 et les courbes

2 et 3 de la figure 4, on constate qu'à 100°C ces substances activantes sont libérées en plus grande quantité qu'à 68°C.

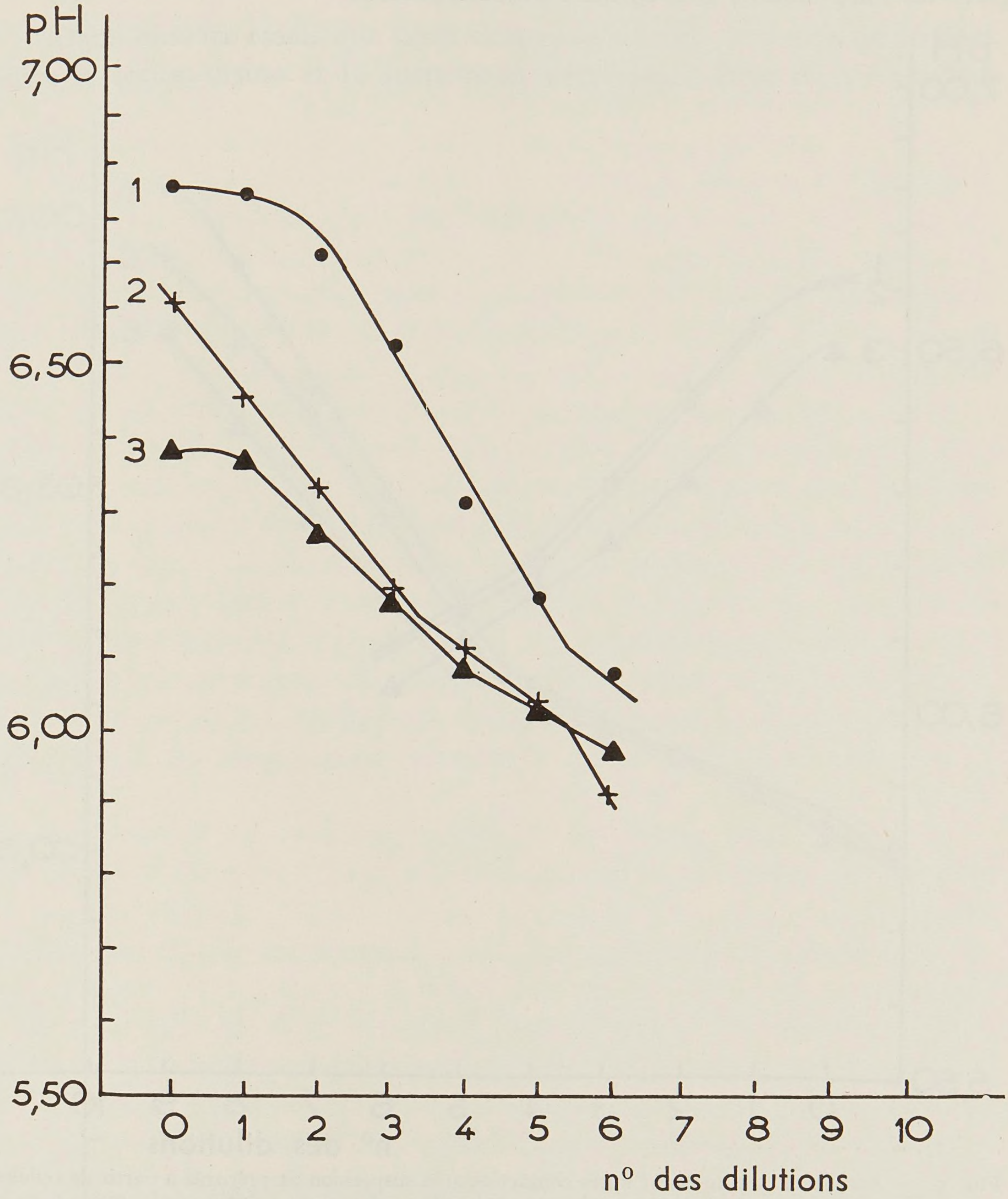


Fig. 4. — Activité du sérum-nisine après contact avec la suspension S1 lavée puis chauffée de *T. tarbellicus*. — Courbe 1 : dosage de la nisine dans le tube témoin sans cellule bactérienne. — Courbe 2 : dosage de la nisine dans le tube contenant la suspension S1 ni lavée, ni chauffée. — Courbe 3 : dosage de la nisine dans le tube contenant la suspension S1 lavée et chauffée 10 min. au bain-marie bouillant.

c) **Cellules soumises à une incubation prolongée**

200 ml d'une culture de *T. tarbellicus* parvenue en fin de croissance logarithmique sont répartis en deux portions de 100 ml ; l'une est d'abord placée 10 minutes au bain-marie bouillant puis incubée pendant 12 heures

à 68°C, l'autre est incubée directement à 68°C pendant 12 heures sans subir le chauffage préalable. Après cette incubation prolongée, on prépare les suspensions S 1 comme précédemment.

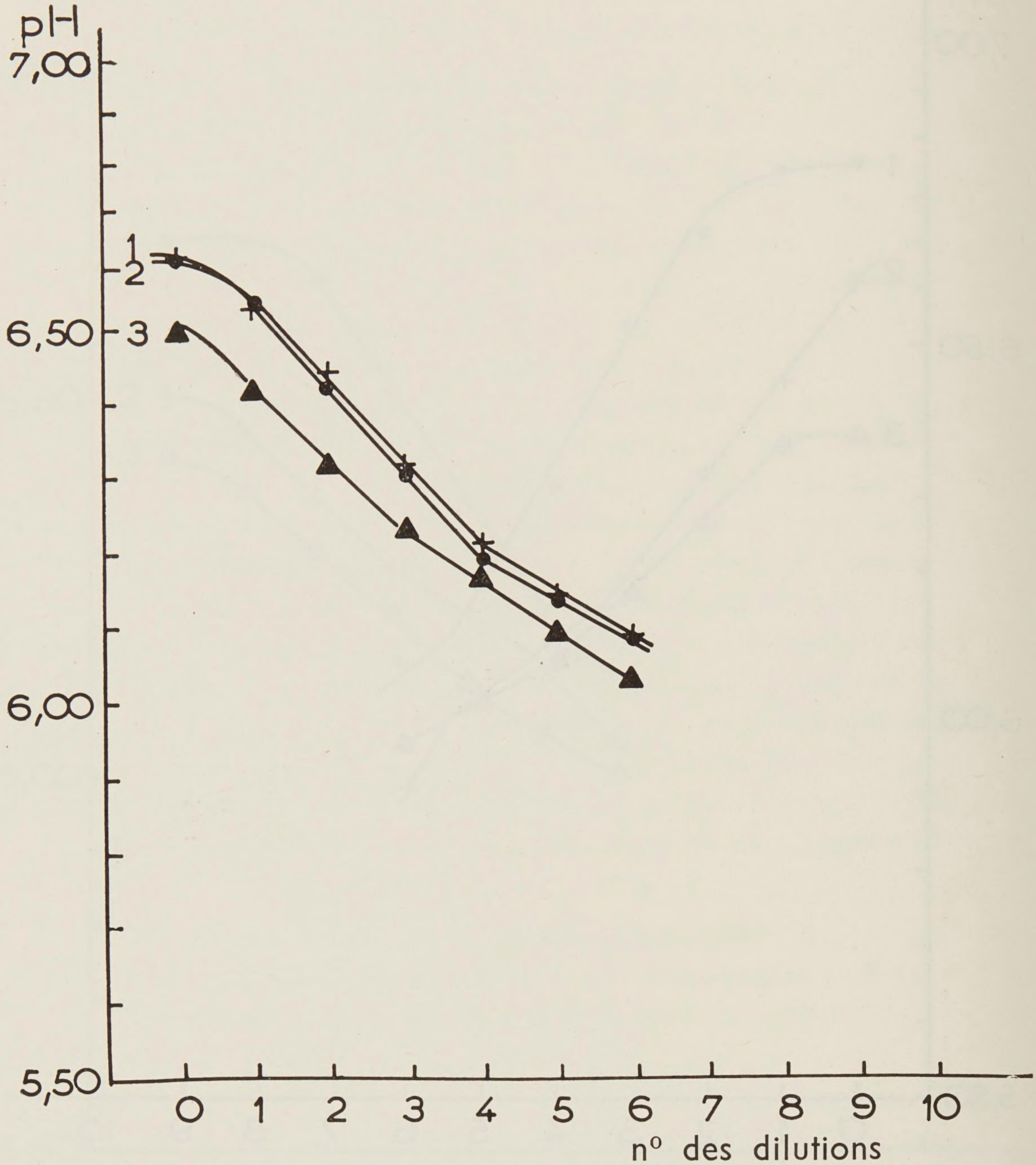


FIG. 5. — Activité du sérum-nisine après contact avec la suspension S1 préparée à partir de cellules de *T. tarbellicus* soumises à une incubation prolongée. — Courbe 1 : dosage de la nisine dans le tube témoin sans cellule bactérienne. — Courbe 2 : dosage de la nisine dans le tube contenant la suspension S1 préparée à partir de cellules incubées 12 h à 68°C. — Courbe 3 : dosage de la nisine dans le tube contenant la suspension S1 préparée à partir de cellules maintenues 10 min. au bain-marie bouillant puis incubées 12 h à 68°C.

La comparaison des courbes 1, 2 et 3 de la figure 5 montre *a*) qu'une incubation prolongée des cellules bactériennes, qui les place dans la phase d'autolyse, fait disparaître leur propriété de diminuer l'activité du sérum-nisine, mais *b*) que le chauffage préalable à 100°C de ces cellules leur conserve partiellement cette propriété, même après une incubation prolongée.

3° Influence du temps de contact avec les cellules de *T. tarbellicus* sur la diminution d'activité du sérum-nisine.

Dans tous les essais que nous venons de décrire, le temps de contact entre le sérum-nisine et la suspension bactérienne était de 10 minutes

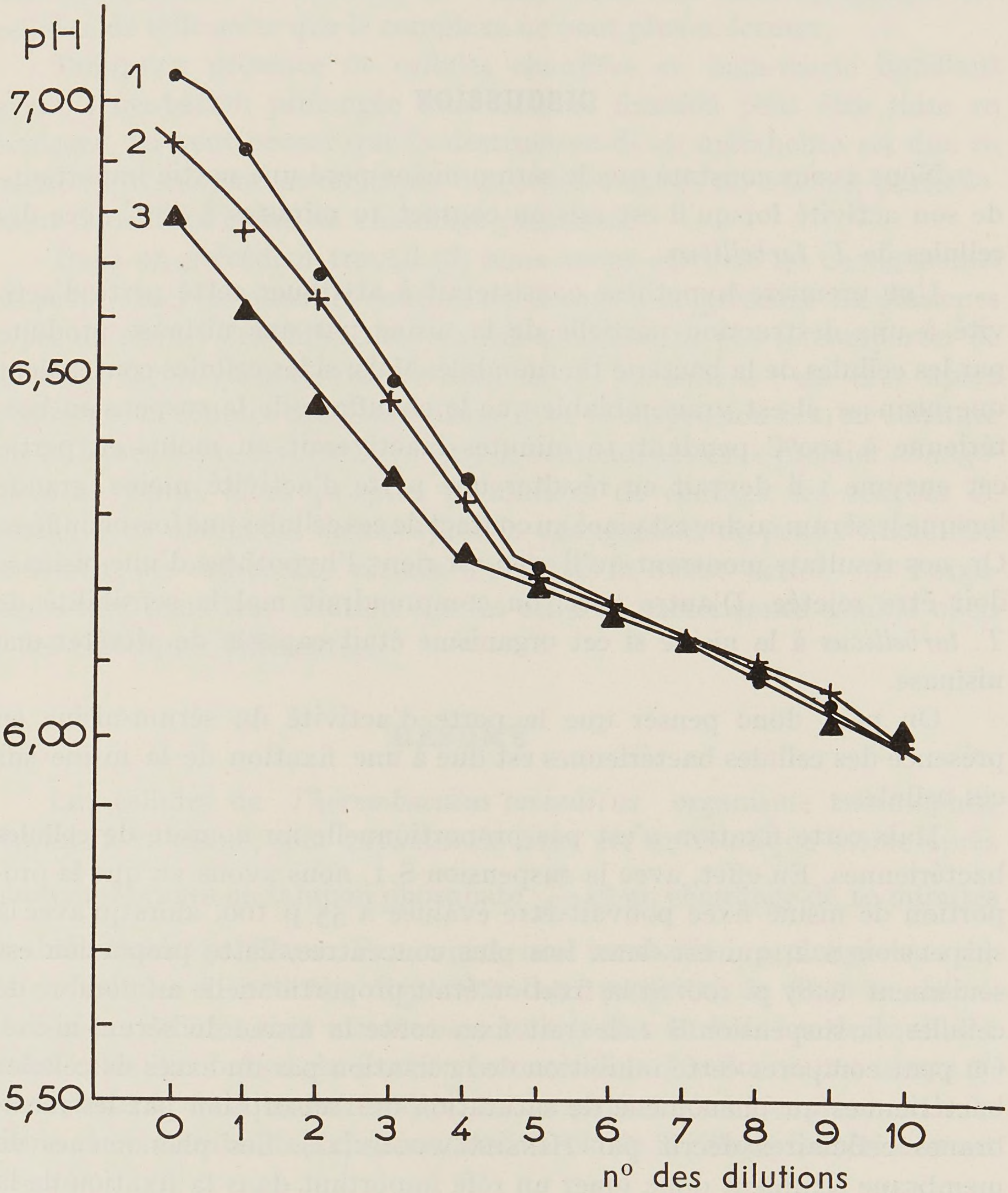


FIG. 6. — Activité du sérum-nisine après contact pendant des temps variables avec la suspension S1 de *T. tarbellicus*.
Courbe 1 : dosage de la nisine dans le tube témoin sans cellule bactérienne.
Courbe 2 : dosage de la nisine dans le tube contenant la suspension S1 après 1 minute de contact.
Courbe 3 : dosage de la nisine dans le tube contenant la suspension S1 après 5 minutes de contact.

à 68°C. La figure 6 montre la diminution d'activité du sérum-nisine lorsque le temps de contact avec la suspension S 1 est de 1 minute à 68°C (courbe 2) et de 5 minutes à 68°C (courbe 3). On voit que la perte d'activité du

sérum-nisine est plus marquée après 5 minutes qu'après 1 minute de contact. Par conséquent, plus la durée de contact entre la suspension S 1 et le sérum-nisine est longue, plus la diminution d'activité est sensible. Nous avons vérifié d'autre part que le sérum-nisine dilué dans le tampon phosphate sans cellule bactérienne conserve la même activité après 1 minute ou après 5 minutes de séjour à 68°C.

DISCUSSION

Nous avons constaté que le sérum-nisine perd une partie importante de son activité lorsqu'il est mis en contact 10 minutes à 68°C avec des cellules de *T. tarbellicus*.

Une première hypothèse consisterait à attribuer cette perte d'activité à une destruction partielle de la nisine par une nisinase produite par les cellules de la bactérie thermophile. Mais, si les cellules contenaient une nisinase, il est vraisemblable que le chauffage de la suspension bactérienne à 100°C pendant 10 minutes inactiverait au moins en partie cet enzyme : il devrait en résulter une perte d'activité moins grande lorsque le sérum-nisine est placé au contact de ces cellules une fois chauffées. Or, nos résultats montrent qu'il n'en est rien ; l'hypothèse d'une nisinase doit être rejetée. D'autre part, on comprendrait mal la sensibilité de *T. tarbellicus* à la nisine si cet organisme était capable de sécréter une nisinase.

On peut donc penser que la perte d'activité du sérum-nisine en présence des cellules bactériennes est due à une fixation de la nisine sur ces cellules.

Mais cette fixation n'est pas proportionnelle au nombre de cellules bactériennes. En effet, avec la suspension S 1, nous avons vu que la proportion de nisine fixée pouvait être évaluée à 55 p. 100, alors qu'avec la suspension S 2, qui est deux fois plus concentrée, cette proportion est seulement de 87 p. 100. Si la fixation était proportionnelle au nombre de cellules, la suspension S 2 devrait fixer toute la nisine du sérum-nisine. On peut comparer cette inhibition de la fixation par un excès de cellules bactériennes au phénomène de saturation de l'adsorption par les membranes cellulaires décrit par Hinshelwood (11). Les phénomènes de membrane semblent donc jouer un rôle important dans la fixation de la nisine.

Nous avons vu que le phénomène observé par Newton (10) et Few (6) pour la polymyxine n'avait pas lieu dans le cas de la nisine : la fixation de la nisine sur les cellules bactériennes sensibles n'est pas liée à l'apparition dans le surnageant de substances absorbantes à 260 mμ.

Mais cela n'exclut pas l'hypothèse de Hirsch (2) : la fixation de

la nisine serait le résultat d'un complexe formé par la nisine avec un métabolite essentiel à la vie cellulaire. Nos résultats montrent que, si l'on admet cette hypothèse, le métabolite est *endocellulaire* puisque la fixation a lieu avec les cellules lavées, *thermostable* puisque la fixation a lieu avec des cellules maintenues au bain-marie bouillant, mais *susceptible d'être détruit ou dénaturé* au cours d'une incubation prolongée des cellules, de telle sorte que le complexe ne peut plus se former.

Puisqu'en présence de cellules chauffées au bain-marie bouillant avant l'incubation prolongée une certaine fixation peut être mise en évidence, on peut penser que la destruction de ce métabolite est due en partie à un enzyme autolytique des cellules de *T. tarbellicus*, partiellement détruit au cours du chauffage préalable.

Dans un précédent travail (8) nous avons attribué les changements de pente observés dans les courbes de dosage à la présence de plusieurs types de nisine. Ces différentes nisines semblent ne pas se comporter de la même façon vis-à-vis des cellules de *T. tarbellicus* : en effet après 5 minutes de contact du sérum-nisine avec la suspension S 1, on constate sur la figure 6 que les courbes 1 et 3 se confondent dès le premier changement de pente, alors qu'après 10 minutes de contact, les courbes de dosage sont distinctes même après le changement de pente. Ainsi, non seulement ces différentes nisines n'ont pas la même action sur l'organisme-test, mais leur fixation sur les cellules bactériennes semble obéir à des cinétiques différentes.

RÉSUMÉ

Les cellules de *Thermobacillus tarbellicus*, organisme thermophile sensible à la nisine, sont capables de fixer cet antibiotique même après plusieurs lavages en tampon phosphate $\frac{M}{100}$ et un chauffage de 10 minutes au bain-marie bouillant. Par contre une incubation prolongée (12 h) de ces cellules à 68°C fait disparaître leur propriété de fixer la nisine. Mais si les cellules sont maintenues 10 minutes au bain-marie bouillant avant cette incubation, la fixation a encore lieu. L'influence du temps de contact sur la fixation est étudiée. La formation d'un complexe entre la nisine et un métabolite indispensable à la vie de la cellule bactérienne est discutée.

Nous exprimons notre profonde reconnaissance à M. G. Mocquot et à M. R. Chevalier pour l'aide et les conseils qu'ils nous ont donnés au cours de ce travail.

Reçu pour publication le 29 *mars* 1957.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) HIRSCH (A.) et MATTICK (A. T. R.). — Some recent applications of nisin. *Lancet*, 1949, *ii*, 190.

(2) HIRSCH (A.). — Some polypeptide antibiotics. *J. Appl. Bact.*, **17**, 108, 1954.

(3) NEWTON (B. A.). — The action of Polymyxin on *Pseudomonas pyocyanea*. *J. gen. Microbiol.*, **8**, VI, 1953.

(4) NEWTON (B. A.). — The absorption of Polymyxin by cell wall preparation from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.*, **10**, *iii*, 1954.

(5) NEWTON (B. A.). — Site of action of polymyxin on *Pseudomonas aeruginosa* ; antagonism by cations. *J. gen. Microbiol.*, **10**, 491, 1954.

(6) FEW (A. V.) et SCHULMAN (J. H.). — The absorption of Polymyxin E by bacteria and bacteria cell walls and its bactericidal action. *J. gen. Microbiol.*, **9**, 454, 1953.

(7) FEW (A. V.). — The interaction of Polymyxin E with bacterial and other lipids. *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 137, 1955.

(8) RAIBAUD (P.). — Sur l'emploi d'une bactérie thermophile pour un dosage rapide de la nisine. *Ann. Techn.*, **3**, 441, 1956.

(9) BERRIDGE (N. J.). — Preparation of the antibiotic nisin. *Biochem. J.*, **45**, 486, 1949.

(10) NEWTON (B. A.). — The release of soluble constituents from washed cells of *Pseudomonas aeruginosa* by the action of Polymyxin. *J. gen. Microbiol.*, **9**, 54, 1953.

(11) HINSHELWOOD (C. N.). — *In the* Chemical Kinetics of the bacterial cell. 1946, Oxford, Clarendon Press.

EFFETS DE TRAITEMENTS THERMIQUES, A L'ABRI DE L'AIR, SUR LES QUALITÉS DES VINS DOUX NATURELS

PAR

L. DEIBNER et P. BÉNARD

Station centrale de Recherches sur l'Œnologie, la Cidrerie et les Jus de Fruits, Narbonne (Aude).

Le traitement thermique des Vins Doux Naturels, à l'abri de l'air, en absence ou en présence de catalyseurs métalliques, a fait l'objet de recherches qui ont abouti à des résultats de portée pratique (1). Ces essais se limitaient, en général, à l'emploi de températures moyennes, sans chercher la comparaison entre les traitements à haute et à basse température, employés séparément ou alternativement.

A notre connaissance, seuls GUEORGUIEV, POPOV et LITCHEV (2) ont employé la gamme de températures la plus étendue. Ils ont effectué des essais comparatifs avec les vins de table bulgares en les soumettant, pendant diverses périodes — n'excédant pas 52 jours — à l'action des températures de — 5°C, de + 8°C, de + 35-40° et 90°C, toujours à l'abri de l'air. En cherchant à établir le rôle des esters dans la bonification des propriétés organoleptiques des vins, les œnologues bulgares ont démontré non seulement l'influence de ces substances, mais également l'existence d'une relation entre la diminution du potentiel oxydoréducteur et la formation des esters.

Ces constatations confirment les conceptions de BERTHELOT (3) et les résultats obtenus par HENNIG et VILLFORTH (4) sur le rôle positif des esters dans l'amélioration des qualités organoleptiques des vins. Par contre, les conclusions de TSCHERBAKOV (5) et de PEYNAUD (6), suivant lesquelles les esters n'interviennent pas dans le bouquet des vins, perdent tout au moins leur caractère absolu.

GUEORGUIEV et ses collaborateurs ont pu formuler les conclusions suivantes :

Les températures inférieures ou égales à + 8°C, facilitant la clarification des vins jeunes, font ressortir plus nettement leurs qualités originelles ; par contre, les températures moyennes, de l'ordre de + 35-+ 40°C, produisent des effets améliorants dans le bouquet et dans le goût, mais

seulement dans le cas des vins ayant une forte acidité, un pH bas ; le traitement thermique à + 85-+ 90°C a été reconnu comme nuisible à la qualité des vins.

Notre expérimentation a été effectuée entre le 23 janvier et le 10 mars 1956. On a utilisé non seulement le traitement frigorifique à 0°C et le traitement à + 35°-+ 40°C, mais également un procédé mixte, composé de ces deux traitements répétés alternativement deux ou trois fois.

Nos essais ont porté sur le Vin Doux Naturel en provenance de la Cave de Villeneuve-les-Corbières (Aude), obtenu à partir du raisin Grenache rouge, récolte 1955, vinifié après une courte macération.

Les caractéristiques analytiques de ce vin ont été les suivantes :

Densité à 15°C	1,045
Alcool acquis	15°3, par distillation
Sucre	138 g/litre par densimétrie
Alcool total, acquis et en puissance	22°95
Acidité Volatile	0,22 en g/litre d'acide sulfurique
Acidité Totale	3,25 » » »
pH	3,48

Les essais ont été effectués sur des lots de vin contenu dans des bonbonnes en verre de 4 litres. Les bonbonnes vides ont été remplies préalablement par le gaz carbonique. Après leur remplissage, l'espace libre était de 40 ml pour les essais à froid et de 60 ml pour les essais à l'étuve.

Les expériences ont été exécutées dans les conditions suivantes :

Vin n° 1.

Cet échantillon a séjourné 48 jours au laboratoire dont la température a été assez basse sans dépasser + 15°C.

Vin n° 2.

Ce vin a séjourné 48 jours dans la cave à la température de + 7-+ 10°C.

Vin n° 3.

A séjourné 48 jours au frigorifique à 0°C.

Vin n° 4.

A subi d'abord le traitement frigorifique à 0°C pendant 8 jours et ensuite le traitement thermique à + 35°-+ 40° également pendant 8 jours ; les opérations ont été répétées encore une fois. La durée du traitement complet a été de 32 jours sans tenir compte du temps utilisé pour réchauffer ou refroidir le vin.

Vin n° 5.

Ce vin a été traité de la même manière que le précédent, mais plus longuement : 48 heures, ce qui correspond à 3 traitements à froid et à 3 traitements par la chaleur.

Vin n° 6.

Le vin a été chauffé à + 35°-+ 40°C, à l'étuve électrique, pendant 18 jours.

Vin nº 7.

Le même traitement pendant 36 jours.

Au début du mois d'avril 1956, les vins ont été dégustés et ensuite analysés. Les caractéristiques analytiques des vins, consignées dans le tableau I, ont été obtenues à l'aide des méthodes suivantes :

— l'acidité volatile, d'après le procédé JAULMES, à l'aide de son grand appareil (7) ;

— l'acidité totale suivant la technique de GILLE, utilisant le rouge de phénol comme indicateur (*op. cit.* (7), p. 281) ;

— le sucre suivant la méthode de MOHR — G. BERTRAND (*op. cit.* (7), p. 176) ;

— l'aldéhyde acétique selon le procédé de MARECA CORTÈS et de DE CAMPOS SALCEDO, mis au point pour les vins doux (8) ;

— l'acétal suivant la technique des œnologues précédents (9), basée sur le procédé de dosage de l'acétaldéhyde de CASAS LUCAS (10) et complétée par nous par l'utilisation du procédé de MARECA CORTÈS et de DE CAMPOS SALCEDO destiné aux vins doux (*op. cit.* (8)) ;

— l'indice de brome suivant la méthode de GENEVOIS et de Mlle GATET (11), exposée dans l'ouvrage de RIBÉREAU-GAYON et de PEYNAUD (12) ;

— les esters neutres d'après la méthode d'ESPIL et de PEYNAUD (13) ;

— les esters totaux d'après le procédé de PEYNAUD (*op. cit.* (6), p. 440).

L'examen des données analytiques du tableau I montre que les variations analytiques observées ne sont pas sensibles. On remarque une diminution de la teneur en aldéhyde pour les vins chauffés.

TABLEAU I

Nº	Désignation des échantillons	Acidité en H_2SO_4 g/litre		Aldéhyde acétique mg/l	Acétal mg/l	Esters en milliéq./litre			Sucre g/litre	Indice brome milliéq./litre
		Volatile	Totale			neutre	acides	totaux		
1	Témoin laboratoire.	0,22	3,25	153	8,0	2,0	—	—	—	26
2	Témoin cave......	0,22	3,15	161	—	1,45	—	—	139	31
3	Témoin frigo......	0,22	3,15	161	—	1,6	3,4	5,0	—	28
	Frigo + étuve :									
4	32 jours......	0,23	3,35	149	—	1,8	4,2	6,0	—	28
5	48 jours......	0,22	3,25	146	—	2,1	2,9	5,0	—	27
	Etuve :									
6	18 jours......	0,25	3,25	136	—	2,6	—	—	—	28
7	36 jours......	0,22	3,2	149	8,8	2,8	—	—	140	27

Presque aucun changement pour l'acétal. Egalement, la teneur en sucre reste invariable. En effectuant ce dernier dosage, nous avions à l'esprit les constatations de BROUSSILOVSKII et KISCHKOVSKII (14), sur la diminution de la quantité du sucre dans les vins de dessert doux

dans les vins du type Porto, soumis au chauffage à + 70°C pendant 3 jours, et enrichis préalablement en azote aminé. Les esters neutres ont été présents dans les vins en quantités normales, comparables à celles trouvées par PEYNAUD dans quelques vins doux naturels (15). La même remarque concerne les esters acides et totaux.

GUEORGUIEV, POPOV et LITCHEV (*op. cit.* (2)) n'ont pas trouvé des esters neutres dans les vins expérimentés ; en ce qui concerne la variation des teneurs en esters acides dans les vins chauffés à 35°-40°C elle a été tantôt nulle, tantôt double par rapport aux vins non chauffés. Dans notre cas, la variation des teneurs en esters acides ne donne pas d'idée précise. Obtenues par différence, ces teneurs dépendent de l'exactitude des méthodes de dosage des esters neutres et totaux. Or, le dosage des esters totaux d'après la méthode de PEYNAUD (*op. cit.* (6)) ne nous a pas donné des résultats sûrs.

Par la suite, nous avons appris, mais trop tardivement, l'existence de la variante de cette méthode, mise au point par M^lle^ PIMENTEL DIAS pour les vins de Porto (16) ; ce travail complète la publication de CASTRO REIS (17).

L'examen organoleptique des vins, effectué par plusieurs dégustateurs a donné lieu à des conclusions intéressantes réunies dans le tableau II.

TABLEAU II

Vins		n° 1 (5-4-56)		n° 2 (5-4-56)		n° 3 (6-4-56)	
N°	Désignation	Classement	Observations	Classement	Observations	Classement	Observations
1	Témoin labo...					5	Oxydé
2	Témoin cave..	6	Jeune			4	Jeune
3	Témoin frigo..	5	Goût d'alcool et de sucre			4	Jeune
	Frigo + étuve :						
4	32 jours	4	Fruité	4	Moins bon que (6)	3	Meilleur que les précédents
	48 jours	3	Plus aromatique goût d'alcool moindre que pour (4)	3		3	
	Etuve :						
6	18 jours	2	Moins bon que (7)	2	Meilleur que (4)	2	Grosse différence avec (2) ; plus vieux, plus fondu
7	36 jours	1	Plus souple, plus vieux, plus évolué, pas de dureté en alcool	1	1 an d'avance, en âge au moins Meilleur vin	1	Meilleur vin ; avance de 2 ans en âge

Les conclusions de dégustation peuvent être résumées comme suit :

1° Le séjour au frigorifique ne vieillit pas le vin.

2° Le traitement alterné (froid-chaleur) provoque une certaine amélioration des vins par rapport aux échantillons non chauffés.

3° Le chauffage seul produit une amélioration sensible, et cela en fonction de la durée du traitement ; le vin chauffé pendant 36 jours se classe en tête, son âge apparent étant évalué à 2-3 ans, ce qui correspond à un gain d'un an ou de deux ans.

4° Comparativement, le traitement mixte pendant 32 jours, comprenant le chauffage pendant 16 jours, produit un vin moins bon par rapport au vin uniquement chauffé pendant 18 jours, le froid retardant la maturation.

Ainsi se trouve démontrée, encore une fois, la supériorité du traitement thermique, à l'abri de l'air, pour les Vins Doux Naturels, déjà signalée dans nos précédentes publications (*op. cit.* (1)).

Comme nous l'avons vu, l'emploi du froid seul ne permet que d'assurer la netteté des perceptions des qualités organoleptiques originelles du vin.

Suivant les observations de Guerassimov (18) dans le cas des Vins Doux alcoolisés, la température de refroidissement doit être plus basse que — 7°C. A priori, de telles températures nous paraissent trop basses pour les Vins Doux Naturels en raison de leur acidité totale souvent insuffisante.

La pratique a démontré que le froid seul et le chauffage seul ne permettent pas d'obtenir sûrement la stabilisation du vin au point de vue de sa limpidité. Par contre, la combinaison de ces deux procédés est susceptible de donner des résultats infiniment meilleurs (19-*a*). La durée de chaque traitement constitue un problème important. En ce qui concerne les vins de dessert alcoolisés, les délais de leur chauffage à l'abri de l'air ont été précisés par Guerassimov (19-*b*).

La priorité d'emploi de ces deux traitements, thermique et frigorifique, reste à étudier. Toutefois, le froid consécutif au chauffage est favorable à l'élimination plus complète des protéides.

Le traitement d'un vin par chauffage avant son traitement frigorifique présente des inconvénients ; en effet, il favorise la formation des colloïdes et peut s'opposer à la précipitation du bitartrate (20).

Tout récemment, Machavariani (21) a comparé l'influence de neuf combinaisons de différents traitements œnotechnologiques sur les qualités organoleptiques d'un vin blanc destiné à la champagnisation. La combinaison utilisant successivement le tanisage, collage, filtration, froid, pasteurisation, filtration, a permis d'obtenir un vin limpide et supérieur à d'autres échantillons ayant subi ces mêmes traitements appliqués soit de manières différentes, soit incomplètement. L'emploi du froid après la pasteurisation s'avérait moins effectif.

En ce qui concerne les Vins Doux Naturels, les données expérimentales manquent encore pour la mise au point de schémas technologiques permettant d'accélérer la maturation de ces vins en fonction de leurs caractéristiques.

Reçu pour publication le 5 avril 1957.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) DEIBNER (L.), BÉNARD (P.). — Recherches sur la maturation des Vins Doux Naturels. — *a*) I. — Influence du traitement thermique prolongé à l'abri de l'air. *Ann. Techn. Agr.*, I. N. R. A., **5**, n° 3, 357, 1956.— *b*) II. — Essai de catalyseurs métalliques. *Ibidem*, 377.

(2) GUEORGUIEV (L.), POPOV (L.), LITCHEV (V.). — L'estérification et le potentiel d'oxydoréduction dans les vins indigènes en relation avec leur maturation et leur vieillissement. (Titre trad.) Godischnik Vissch. Selskokhoz. Instituta V. Kolarov (*Annuaire Inst. Sup. Agron. V. Kolarov*), Plovdiv, Bulgarie, **6**, 1, 1950-1951.

(3) BERTHELOT (M.). — Recherches sur les vins et leur bouquet. *Chimie Vég. et Agr.*, **4**, Paris 1899.

(4) *a*) HENNIG (K.), VILLFORTH (F.). — Die Aromastoffe der Weine. *Vorratspflege u. Lebensmittelforsch.*, **5**, 181 et 313, 1942. — *b*) HENNIG (K.). — Les substances de l'arôme des vins. Nouveaux procédés de détermination de la qualité des vins. *Bull. Office Int. Vin*, **16**, n° 158, 8, 1943.

(5) TSCHERBAKOV (M.). — Vieillissement du vin (Titre trad.) Zapiski Obsch. Selsko-Khoz. Ujnoï Rossiï (*Proc. verb. Soc. Agr. Russie mérid.*) 1903. — *Vinogradarstvo i Vinodélié* (*Viticulture et Œnologie*) Russie 4, 1905, 11, 12 1906, (d'après FROLOV-BAGREEV (A.), AGABALIANTZ (G.), *Chimie du Vin* (Titre traduit) 1951, Moscou).

(6) PEYNAUD (E.). — Les phénomènes d'estérification dans les vins. Diplôme d'Ét. Sup. 1936, Bordeaux. *Revue Vit.*, **86**, 209 et suite, 1937.

(7) JAULMES (P.). — *Analyse des vins*. 1951, 390, Montpellier, Poulain éd.

(8) MARECA CORTÈS (I.), DE CAMPOS SALCEDO (M.). — Le dosage de l'éthanol dans les vins doux et boissons analogues. *Ann. Fals. Fraudes*, **48**, 479, 1955.

(9) MARECA-CORTÈS (I.), DE CAMPOS SALCEDO (M.). — Metode para la determicación de acetal en vinos, bebidas alcoholicas en general y soluciones analogas. *Anales Real. Soc. Esp. Fis. Quim.*, **51**-B, n° 1, 85, 1955.

(10) CASAS LUCAS (J.). — La determinación de acetaldehido con los metodos al bisulfito y su aplicación al analisis de vinos. *Rev. Ciencia Apl.*, 8, 103, 1954.

(11) GENEVOIS (L.), GATET (M^lle^ L.). — Indice de brome de glucose et des substances phénoliques. Application à l'étude de la maturation du raisin. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **5**, 578, 1938.

(12) RIBÉREAU-GAYON (J.), PEYNAUD (E.). — *Analyse et contrôle des vins*. 1947, 408, Paris-Liège, Béranger éd.

(13) ESPIL (L.), PEYNAUD (E.). — Dosage des esters neutres dans les milieux de fermentation. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **3**, 2324, 1936. — Dosage des esters dans les milieux de fermentation. Ibidem, **4**, 904, 1937.

(14) BROUSSILOVSKII (S.), KISCHKOVSKII (Z.). — Quelques questions de la technologie d'élaboration du champagne soviétique (Titre traduit). *Vinodélié i Vinogradarstvo* (*Œnologie et Viticulture*) S. S. S. R., n° 6, 20, 1954.

(15) PEYNAUD (E.). — Analyses complètes de huit vins doux naturels. *Ann. Agron.* I. N. R. A., **1**, n° 3, 382, 1950.

(16) PIMENTEL DIAS (M^lle^ M.). — O doseamento dos esteres totais do vinho do Porto. *Annais Inst. Vinho do Porto* 1952.

(17) DE CASTRO REIS (A.). — Esteres no vinho do Porto. *Annais Inst. Vinho do Porto*, 1946.

(18) GUERASSIMOV (M.). — Clarification et amélioration des vins par le froid (Titre traduit). *Troudi Nàoutch-izled. Instituta vinogradarstva i vinodeliya* (*Trav. Inst. Vit. Œnol.*) Tbilissi, S. S. S. R., 1938 (d'après GUERASSIMOV (M.). Travaux choisis sur l'Œnologie, 1955, 236, Moscou).

(19) GUERASSIMOV (M.). — *a*) Maturation accélérée du vin (Titre traduit). *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., n° 7, 1955. — *b*) Régimes du traitement thermique des vins de différents types (Titre traduit). *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., n° 2, 1955.

(20) RIBÉREAU-GAYON (J.). — *Traité d'Œnologie*, 1950, 175, 407, 427. Paris-Liège, Béranger éd.

(21) MACHAVARIANI (N.). — Accélération de la maturation des vins destinés à la champagnisation (Trad.). *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., n° 10, 21, 1953.

(19) [illegible] (M.). — a) Maturation accélérée du vin (Titre traduit). [illegible] i Vinogradarstvo, S.S.S.R., n° [illegible], 1953. — b) Régimes du traitement thermique des vins de différents types (Titre traduit). [illegible] i Vinogradarstvo, S.S.S.R., n° [illegible], 1953.
(20) Ribéreau-Gayon (J.). — Traité d'Œnologie, 1950, [illegible]. Paris, Béranger éd.
(21) [illegible] (I.). — Accélération de la maturation des vins destinés à la champagnisation (Titre traduit). Vinodelie i Vinogradarstvo, S.S.S.R., n° 10, 1953.

ÉVOLUTION DES PRINCIPAUX CONSTITUANTS DE LA POIRE A POIRÉ AU COURS DE LA CROISSANCE DU FRUIT

DEUXIÈME MÉMOIRE

PAR

P. JACQUIN et Mme J. CHEREL
Station de Recherches pomologiques et cidricoles, Rennes

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

II. — Evolution des divers constituants.

1. Présentation des conditions analytiques.
2. Méthodes analytiques.
3. Résultats analytiques.

III. — Interprétation des résultats.

1. Comparaison des années 1950 et 1954.
 — La poire Graneville en 1950 et en 1954.
 — Les principaux facteurs météorologiques des deux années.
2. L'acidité organique des poires.
 — Acidité de titration.
 — Alcalinité des cendres.
 — Acide malique.
 — Acide citrique.
 — Acides organiques indosés.
 — Réaction pH.
3. Les glucides : saccharose, glucose, lévulose.
4. Le sorbitol.
5. Les matières tannoïdes.
6. Les substances azotées.

IV. — Conclusions.

I. — INTRODUCTION

Dans un précédent mémoire (1), nous avons déjà suivi l'évolution de plusieurs constituants de la poire à poiré au cours de la maturation. Cette étude avait été menée sur 4 variétés dont une était riche en acide

citrique (*Graneville*). Nous avons cru devoir reprendre cette étude en la poursuivant sur 6 variétés, dont *Graneville* qui sert en quelque sorte de témoin avec le travail précédent. Parmi ces variétés, seule une variété, *Fausset*, est pauvre en acide citrique, pour les 5 autres, l'acide citrique représente de 30 à 60 p. 100 de l'acidité totale.

Au cours de cette étude, nous avons repris le dosage des mêmes éléments que précédemment, et de plus nous avons suivi l'évolution de l'azote total dans le fruit, de l'azote passant en solution dans le jus, des tannoïdes différenciés en tanin vrais et polyphénols non tanin d'après la méthode BRUGIRARD et TAVERNIER (2), et nous avons également fait des dosages de sorbitol en début et en fin de croissance. Enfin nous avons poursuivi ces expériences plus avant dans le temps (un mois), le dernier prélèvement de fruits étant effectué alors que pour plusieurs variétés, la maturité de brassage était dépassée ; les fruits étant ou blets ou en voie de blettissement, ce qui se traduit par des modifications parfois importantes pour certains constituants.

Ce travail n'a pas la prétention d'être une étude physiologique stricte de la croissance des fruits. Il ne doit être considéré que comme une étude préliminaire ayant pour but de dégrossir le problème. Mais dans l'état actuel il nous a été impossible d'aller plus loin dans nos investigations, qui restent superficielles et qui demanderont à être reprises lorsque les possibilités nous en seront données.

Nous voudrions les orienter plus particulièrement sur le métabolisme des différentes formes de l'azote, des tannoïdes, des polyphénols et des acides organiques, dont une fraction assez importante reste inconnue et échappe aux dosages classiques.

II. — ÉVOLUTION DES DIVERS CONSTITUANTS DE LA POIRE

1. Présentation des conditions analytiques

Nous avons effectué pour chacune des 6 variétés étudiées, cinq prélèvements de fruits, échelonnés à peu près régulièrement de la nouaison à la maturité de brassage. Pour chaque prélèvement nous avons cueilli les fruits sur tout le pourtour de l'arbre afin d'obtenir environ 2 kg de fruits pour chaque lot, sauf aux deux premiers prélèvements, où étant donné le faible poids du fruit, nous n'avons pas dépassé 1 kg. Nous avons alors pesé chaque lot et comparé le nombre de fruits y contenus.

Le tableau suivant résume les renseignements utiles sur les différents prélèvements.

TABLEAU I

	Prélèvement n°				
	1	2	3	4	5
Date des prélèvements	15/6/54	2/8/54	30/8/54	30/9/54	3/11/54
Fausset :					
Nombre de jours après pleine floraison (30 avril)	45	93	121	152	186
Nombre de fruits au kg	400	88	48	27,4	18,8
Poids d'une poire en g	2,50	11,36	20,83	36,6	53,3
Coignet :					
Nombre de jours après pleine floraison (23 avril)	52	100	128	159	193
Nombre de fruits au kg	428	148	84	61,2	37,2
Poids d'une poire en g	2,33	6,75	11,90	16,3	26,9
Graneville :					
Nombre de jours après pleine floraison (23 avril)	52	100	128	159	193
Nombre de fruits au kg	400	106	52	32,1	25
Poids d'une poire en g	2,50	9,43	19,23	31,1	40,0
Muscadet :					
Nombre de jours après pleine floraison (23 avril)	52	100	128	159	193
Nombre de fruits au kg	380	104	55	34,8	25,2
Poids d'une poire en g	2,63	9,61	18,18	28,7	39,7
Navet :					
Nombre de jours après pleine floraison (23 avril)	52	100	128	159	193
Nombre de fruits au kg	380	122	59	39,3	42,3
Poids d'une poire en g	2,63	8,20	16,95	25,4	23,6
Rouge Vigny :					
Nombre de jours après pleine floraison (19 avril)	56	104	132	163	197
Nombre de fruits au kg	212	54	32	18	16,6
Poids d'une poire en g	4,71	18,51	31,25	55,6	60,1

2. Méthodes analytiques

Outre les dosages et déterminations effectués dans notre travail précédent : densité du jus, degré réfractométrique, réaction pH, acidité de titration, alcalinité des cendres, acide malique, acide citrique, sucres, nous avons dosé les tannoïdes en les différenciant par la méthode mise au point par BRUGIRARD et TAVERNIER (2). Nous avons également dosé l'azote total sur la pulpe, ainsi que l'azote soluble du jus par la méthode classique de Kjeldahl, et enfin nous avons dosé la teneur du jus en sorbitol dans les fruits en début de développement et à leur pleine maturité, par la méthode que nous avons publiée précédemment (3).

3. Résultats analytiques

Afin de mieux rendre compte de l'évolution des divers constituants, nous avons rassemblé nos résultats analytiques, dans les tableaux suivants indiquant pour chaque variété, les diverses teneurs rapportées d'une part au litre de jus ou au kilo de pulpe fraîche pour l'azote total, et d'autre part à une poire, afin de faire ressortir l'accumulation des divers composés dans le fruit au cours de sa croissance (tableaux II à XIII).

Tableau II

Poire Fausset

Date du prélèvement	15/6/54	2/8/54	30/8/54	30/9/54	3/11/54
Nombre de jours après pleine floraison	45	93	121	152	186
Poids d'une poire en g	2,50	11,36	20,80	36,6	53,3
Densité du jus à 15°C	1 035,5	1 047	1 049	1 051	1 056,8
Degré réfractométrique à 20°C	8,90	11,00	11,30	12,20	13,35
Réaction pH à 18°C	3,85	3,05	3,00	3,20	3,30
Acidité de titration en milliéq.	110	296	214	153	110
Alcalinité des cendres en milliéq.	117	83	59,5	39	35
Acide malique en milliéq.	116	312	227	157,4	117,1
Acide citrique en milliéq.	3,45	5,12	5,76	5,0	4,40
Tannoïdes totaux en g par litre	8,32	7,04	5,28	4,88	4,00
Polyphénols non tanin en g par litre	4,80	1,92	2,00	1,76	1,60
Tanins vrais en g par litre	3,52	5,12	3,28	3,12	2,40
Sucres totaux en g par litre	10,44	38,56	62,56	83,25	105,75
Sucres réducteurs en g par litre	8,04	35,76	58,72	74,50	84,75
Saccharose en g par litre		2,80	3,84	8,75	20,0
Glucose en g par litre		1,60	10,25	20,20	27,05
Lévulose en g par litre		34,16	48,47	54,30	57,70
Sorbitol en g par litre	12,66				23,84
Azote soluble en mg N par litre	1 341	368,2	125,3	49,0	58,1
Azote total en mg N par kg de pulpe	3 265	1 198,2	721	506,1	504,2

Tableau III

Poire Coignet

Date du prélèvement	15/6/54	2/8/54	30/8/54	30/9/54	3/11/54
Nombre de jours après pleine floraison	52	100	128	159	193
Poids d'une poire en g	2,33	6,75	11,9	16,3	26,9
Densité du jus à 15°C	1 037,5	1 048	1 054	1 058,5	1 062,0
Degré réfractométrique à 20°C	9,65	11,40	13,00	14,10	14,86
Réaction pH à 18°C	3,85	3,15	3,08	3,30	3,40
Acidité de titration en milliéq.	149	328	241	179	127
Alcalinité des cendres en milliéq.	73,2	103	72,5	63	55,5
Acide malique en milliéq.	198	328,5	251,1	166,7	102,6
Acide citrique en milliéq.	12,2	67,7	52,3	46,5	57,0
Tannoïdes totaux en g par litre	11,68	6,80	6,48	5,20	4,72
Polyphénols non tanin en g par litre	5,04	2,72	2,40	1,92	1,76
Tanins vrais en g par litre	6,64	4,08	4,08	3,28	2,96
Sucres totaux en g par litre	14,12	40,80	69,28	91,75	115,75
Sucres réducteurs en g par litre	12,88	38,72	67,20	89,00	109,25
Saccharose en g par litre		2,08	2,08	2,75	6,10
Glucose en g par litre		6,80	13,35	17,65	25,10
Lévulose en g par litre		31,92	53,85	71,35	84,15
Sorbitol en g par litre	11,86				18,83
Azote soluble en mg N par litre	501	152,6	83,3	52,5	39,2
Azote total en mg N par kg de pulpe	2 152	1 051,2	640	485,5	646,3

Tableau IV

Poire Graneville

Date du prélèvement	15/6/54	2/8/54	30/8/54	30/9/54	3/11/54
Nombre de jours après pleine floraison	52	100	128	159	193
Poids d'une poire en g	2,5	9,43	19,2	31,1	40,0
Densité du jus à 15°C	1 036,5	1 050,0	1 059,0	1 061,0	1 066,0
Degré réfractométrique à 20°C	8,75	12,20	14,40	14,40	15,56
Réaction pH à 18°C	4,15	3,20	3,10	3,45	3,60
Acidité de titration en milliéq.	107	286	186	146	97
Alcalinité des cendres en milliéq.	127,2	106	63	64	46
Acide malique en milliéq.	155	316,3	160,6	102,8	35
Acide citrique en milliéq.	7,9	18,5	67,0	96	85
Tannoïdes totaux en g par litre	4,96	5,20	6,40	5,36	3,52
Polyphénols non tanin en g par litre	2,40	1,34	1,12	0,96	0,88
Tanins vrais en g par litre	2,56	3,86	5,28	4,40	2,64
Sucres totaux en g par litre	9,64	39,52	83,32	106,50	126,50
Sucres réducteurs en g par litre	8,80	39,28	79,68	98,50	120,0
Saccharose en g par litre		0,24	3,64	8,00	6,50
Glucose en g par litre		8,38	9,36	27,10	34,95
Lévulose en g par litre		30,90	70,32	71,40	86,05
Sorbitol en g par litre	12,96				20,93
Azote soluble en mg N par litre	2 642	1 099	279,3	147,0	254,1
Azote total en mg N par kg de pulpe	4 276	2 083	1 142,0	974,8	1 157,3

Tableau V

Poire Muscadet

Date du prélèvement	15/6/54	2/8/54	30/8/54	30/9/54	3/11/54
Nombre de jours après pleine floraison	52	100	128	159	193
Poids d'une poire en g	2,63	9,60	18,18	28,7	39,7
Densité du jus à 15°C	1 043	1 055	1 060,5	1 062,0	1 066,7
Degré réfractométrique à 20°C	11,90	13,90	15,0	15,00	15,85
Réaction pH à 18°C	3,65	2,95	2,90	3,15	3,40
Acidité de titration en milliéq.	194	421	310	203	144
Alcalinité des cendres en milliéq.	114	97	63	52	47
Acide malique en milliéq.	185	401	230,4	120,3	57,3
Acide citrique en milliéq.	5	34,5	108,0	108,5	113,5
Tannoïdes totaux en g par litre	19,12	9,60	8,00	5,92	4,64
Polyphénols non tanin en g par litre	7,76	2,88	2,32	1,60	1,28
Tanins vrais en g par litre	11,36	6,72	5,68	4,32	3,36
Sucres totaux en g par litre	11,24	42,88	69,92	100,50	130,25
Sucres réducteurs en g par litre	10,44	41,28	69,92	97,75	113,00
Saccharose en g par litre		1,60	0	2,75	17,00
Glucose en g par litre		0,95	6,05	14,40	21,05
Lévulose en g par litre		40,33	63,87	83,35	91,95
Sorbitol en g par litre	9,32				15,30
Azote soluble en mg N par litre	709	200,2	120,4	62,3	55,3
Azote total en mg N par kg de pulpe	2 431	1 016,4	596	607,3	871,6

TABLEAU VI

Poire Navet

Date du prélèvement	15/6/54	2/8/54	30/8/54	30/9/54	3/11/54
Nombre de jours après pleine floraison	52	100	128	159	193
Poids d'une poire en g	2,63	8,20	16,9	25,4	23,6
Densité du jus à 15°C	1 036	1 049	1 055	1 058,5	1 053,7
Degré réfractométrique à 20°C	9,00	11,60	12,80	13,60	12,56
Réaction pH à 18°C	4,10	3,28	3,20	3,45	3,95
Acidité de titration en milliéq.	85	224	157	102	43
Alcalinité des cendres en milliéq.	117,5	95	66,5	41	46
Acide malique en milliéq.	128,0	254,2	137,6	66,3	36,2
Acide citrique en milliéq.	7,2	29,3	62,2	68,75	39,5
Tannoïdes totaux en g par litre	7,28	4,80	4,56	2,48	0,72
Polyphénols non tanin en g par litre	3,20	1,92	1,92	1,28	0,72
Tanins vrais en g par litre	4,08	2,88	2,64	1,20	0
Sucres totaux en g par litre	17,76	48,16	80,32	107,50	108
Sucres réducteurs en g par litre	14,80	45,76	80,32	98,50	100,5
Saccharose en g par litre		2,40		9,00	7,4
Glucose en g par litre		3,13	14,92	22,50	11,85
Lévulose en g par litre		42,63	65,40	76,00	88,70
Sorbitol en g par litre	14,92				15,47
Azote soluble en mg N par litre	714	198,8	89,6	55,3	77,7
Azote total en mg N par kg de pulpe	2 657	1 129,2	727,0	633,8	664,2

TABLEAU VII

Poire Rouge Vigny

Date du prélèvement	15/6/54	2/8/54	30/8/54	30/9/54	3/11/54
Nombre de jours après pleine floraison	56	104	132	163	197
Poids d'une poire en g	4,71	18,51	31,2	55,6	60,1
Densité du jus à 15°C	1 038	1 049	1 052	1 058	1 059,5
Degré réfractométrique à 20°C	9,50	11,80	12,20	13,60	14,26
Réaction pH à 18°C	4,00	3,05	2,90	3,10	3,20
Acidité de titration en milliéq.	106	257	237	191	140
Alcalinité des cendres en milliéq.	99,5	70	50	42	39,5
Acide malique en milliéq.	131	261,5	200	151,4	104,2
Acide citrique en milliéq.	6,8	32,3	70	53	59,0
Tannoïdes totaux en g par litre	7,04	6,24	4,96	3,20	1,36
Polyphénols non tanin en g par litre	4,16	2,56	2,08	1,68	1,28
Tanins vrais en g par litre	2,88	3,68	2,88	1,52	0,08
Sucres totaux en g par litre	19,92	49,76	77,44	100,50	118,75
Sucres réducteurs en g par litre	18,20	49,28	73,34	92,50	109,25
Saccharose en g par litre		0,48	4,10	8,00	9,50
Glucose en g par litre		6,46	12,87	21,50	29,10
Lévulose en g par litre		42,82	60,47	71,00	80,15
Sorbitol en g par litre	16,16				20,02
Azote soluble en mg N par litre	687	184,8	119	119,7	163,8
Azote total en mg N par kg de pulpe	2 288	893,4	630	536,4	757,2

TABLEAU VIII

Poire Fausset

Dans un fruit

Prélèvement n°	1	2	3	4	5
Poids d'un fruit en g	2,50	11,36	20,83	36,6	53,3
Acidité de titration en milliéq.	0,212	2,890	3,904	4,955	5,214
Acide malique en milliéq.	0,23	3,01	4,15	5,07	5,49
Acide citrique en milliéq.	0,007	0,05	0,106	0,16	0,23
Rapport $\frac{\text{Acide malique}}{\text{Acide citrique}}$	33,6	60,9	39,4	31,5	26,6
Alcalinité des cendres en milliéq.	0,226	0,810	1,085	1,263	1,659
Sucres totaux en g	0,021	0,372	1,145	2,681	4,960
Sucres réducteurs en g	0,016	0,345	1,075	2,400	3,975
Sucres totaux % Extrait sec total	11,3	33,5	52,8	64,9	74,9
Azote total en mg N	8,162	13,611	14,997	18,523	26,874
Azote soluble en mg N	2,682	3,555	2,293	1,578	2,725
Azote soluble % de l'Azote total	32,86	26,12	15,29	8,52	10,14
Tannoïdes totaux en mg	16,64	68,75	96,32	158,04	189,60
Polyphénols non tanins en mg	9,60	18,75	36,48	57,00	75,84
Tanins vrais en mg	7,04	50,00	59,84	101,04	113,76
Tanins vrais % Tannoïdes totaux	42,3	72,7	62,1	63,9	60,0

TABLEAU IX

Poire Coignet

Dans un fruit

Prélèvement n°	1	2	3	4	5
Poids d'un fruit en g	2,33	6,75	11,90	16,3	26,9
Acidité de titration en milliéq.	0,268	1,901	2,503	2,565	3,024
Acide malique en milliéq	0,350	1,88	2,63	2,38	2,41
Acide citrique en milliéq.	0,023	0,39	0,53	0,67	1,35
Rapport $\frac{\text{Acide malique}}{\text{Acide citrique}}$	16,2	4,85	4,80	3,58	1,80
Alcalinité des cendres en milliéq.	0,134	0,597	0,753	0,903	1,321
Sucres totaux en g	0,026	0,234	0,725	1,316	2,750
Sucres réducteurs en g	0,024	0,222	0,703	1,276	2,586
Sucres totaux % Extrait sec total	14,1	34,2	50,6	61,4	73,3
Azote total en mg N	5,014	7,095	7,616	7,913	17,385
Azote soluble en mg N	1,048	0,875	0,872	0,753	0,928
Azote soluble % de l'Azote total	20,90	12,33	11,45	9,52	5,34
Tannoïdes totaux en mg	21,77	39,38	67,31	74,50	112,38
Polyphénols non tanins en mg	9,39	15,75	24,93	27,51	41,90
Tanins vrais en mg	12,38	23,63	42,38	46,99	70,48
Tanins vrais % Tannoïdes totaux	56,8	60,0	62,9	63,1	62,7

Tableau X

Poire Graneville

Dans un fruit

Prélèvement n°	1	2	3	4	5
Poids d'un fruit en g	2,50	9,43	19,23	31,1	40,0
Acidité de titration en milliéq.	0,207	2,284	3,102	3,980	3,421
Acide malique en milliéq.	0,31	2,53	2,71	2,81	1,23
Acide citrique en milliéq.	0,016	0,15	1,13	2,63	3,00
Rapport $\frac{\text{Acide malique}}{\text{Acide citrique}}$	19,6	17,1	2,39	1,07	0,41
Alcalinité des cendres en milliéq.	0,245	0,847	1,051	1,745	1,622
Sucres totaux en g	0,019	0,317	1,407	2,915	4,452
Sucres réducteurs en g	0,017	0,314	1,346	2,695	4,260
Sucres totaux % Extrait sec total	10,6	30,8	54,6	69,7	76,3
Azote total en mg N	10,690	19,641	21,926	30,316	46,292
Azote soluble en mg N	5,944	8,809	4,719	4,023	8,944
Azote soluble % de l'Azote total	55,60	44,85	21,52	13,27	19,32
Tannoïdes totaux en mg	9,92	42,03	106,75	146,11	124,15
Polyphénols non tanins en mg	4,80	10,83	18,68	26,17	31,04
Tanins vrais en mg	5,12	31,20	88,07	119,94	102,49
Tanins vrais % Tannoïdes totaux	51,6	74,2	82,5	82,1	75,0

Tableau XI

Poire Muscadet

Dans un fruit

Prélèvement n°	1	2	3	4	5
Poids d'un fruit en g	2,63	9,61	18,18	28,7	39,7
Acidité de titration en milliéq.	0,391	3,448	4,897	5,102	5,036
Acide malique en milliéq.	0,39	3,27	3,69	3,04	2,00
Acide citrique en milliéq.	0,011	0,28	1,73	2,74	3,96
Rapport $\frac{\text{Acide malique}}{\text{Acide citrique}}$	37,0	11,62	2,13	1,10	0,50
Alcalinité des cendres en milliéq.	0,230	0,808	0,995	1,307	1,646
Sucres totaux en g	0,023	0,350	1,120	2,780	4,550
Sucres réducteurs en g	0,022	0,337	1,120	2,468	3,947
Sucres totaux % de l'extrait sec total	9,06	29,2	43,9	63,1	77,0
Azote total en mg N	6,393	9,757	10,847	17,430	34,602
Azote soluble en mg N	1,491	1,633	1,928	1,573	1,932
Azote soluble % de l'Azote total	23,32	16,73	17,77	9,02	5,58
Tannoïdes totaux en mg	40,22	78,62	126,37	148,78	162,43
Polyphénols non tanins en mg	16,32	23,58	36,65	40,21	44,81
Tanins vrais en mg	23,90	55,04	89,72	108,57	117,62
Tanins vrais % Tannoïdes totaux	59,4	70,0	71,0	72,9	72,4

TABLEAU XII

Poire Navet

Dans un fruit

Prélèvement n°	1	2	3	4	5
Poids d'un fruit	2,63	8,20	16,95	25,4	23,6
Acidité de titration en milliéq.	0,172	1,576	2,314	2,277	0,906
Acide malique en milliéq.	0,27	1,77	2,05	1,48	0,75
Acide citrique en milliéq.	0,015	0,20	0,92	1,50	0,82
Rapport $\frac{\text{Acide malique}}{\text{Acide citrique}}$	17,7	8,67	2,21	0,96	0,91
Alcalinité des cendres en milliéq.	0,238	0,668	0,980	0,915	0,969
Sucres totaux en g	0,037	0,335	1,195	2,400	2,243
Sucres réducteurs en g	0,031	0,319	1,195	2,202	2,021
Sucres totaux % Extrait sec total	19,0	39,6	59,5	74,7	81,6
Azote total en mg N	6,988	9,260	12,286	16,100	15,675
Azote soluble en mg N	1,502	1,385	1,332	1,237	1,613
Azote soluble % de l'Azote total	21,49	14,95	10,84	7,68	10,29
Tannoïdes totaux en mg	15,31	33,77	67,20	55,37	15,17
Polyphénols non tanins en mg	6,73	13,50	28,29	28,58	15,17
Tanins vrais en mg	8,58	20,27	38,91	26,79	0,00
Tanins vrais % Tannoïdes totaux	56,0	60,0	57,9	48,4	0

TABLEAU XIII

Poire Rouge Vigny

Dans un fruit

Prélèvement n°	1	2	3	4	5
Poids d'un fruit	4,71	18,51	31,2	55,6	60,1
Acidité de titration en milliéq.	0,385	4,081	6,466	9,335	7,469
Acide malique en milliéq.	0,500	4,110	5,490	7,410	5,510
Acide citrique en milliéq.	0,026	0,510	1,920	2,600	3,120
Rapport $\frac{\text{Acide malique}}{\text{Acide citrique}}$	19,2	8,09	2,85	2,85	1,76
Alcalinité des cendres en milliéq.	0,361	1,112	1,364	2,052	2,107
Sucres totaux en g	0,075	0,783	2,126	4,917	6,281
Sucres réducteurs en g	0,068	0,775	2,013	4,526	5,778
Rapport sucres totaux % Extrait sec total	20,2	40,2	60,3	69,8	78,6
Azote total en mg N	10,766	16,537	19,656	29,824	45,507
Azote soluble en mg N	2,588	2,906	3,267	5,856	8,663
Azote soluble % de l'Azote total	24,04	17,57	16,62	19,63	19,03
Tannoïdes totaux en mg	26,52	99,09	135,31	156,39	72,48
Polyphénols non tanins en mg	15,67	40,65	56,75	82,10	68,22
Tanins vrais en mg	10,85	58,44	78,56	74,29	4,26
Tanins vrais % Tannoïdes totaux	40,9	58,9	58,0	47,5	5,9

III. — INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

1. Comparaison des années 1950 et 1954

Il nous a tout d'abord paru intéressant de comparer les données analytiques obtenues sur la poire Graneville en 1950 et en 1954. Par rapport aux résultats de 1950, on observe pour 1954 :

— une plus forte croissance du fruit (40 g au lieu de 30,3) ;

— une densité et une teneur en extrait du jus un peu plus faibles (1066 avec 15,56 d'indice réfractométrique, contre 1068,5 et 16,8 pour 1950) ;

— une somme des cations et une somme acide malique + acide citrique égale ou très voisine ;

— cependant la composition acidimétrique finale est quelque peu différente en 1954 : 85 milliéq. par litre d'acide citrique pour 35 milliéq. par litre d'acide malique, alors qu'en 1950, on avait obtenu : 102 milliéq. d'acide citrique et 15 milliéq. d'acide malique ;

— la composition saccharine est très voisine tant pour les sucres totaux que pour la répartition entre les 3 sucres, on peut noter simplement un taux plus faible en saccharose (6,5 g en 1954 contre 9,7 en 1950, alors que les sucres totaux atteignent 126,5 g en 1954 pour 125,5 g en 1950).

Ces divergences de composition d'une année à l'autre doivent très vraisemblablement trouver leur explication dans les conditions météorologiques différentes selon les années. D'après les relevés météorologiques effectués à Rennes, les huit mois de l'année végétative sont dans leur ensemble plus chauds, plus ensoleillés et plus secs en 1950 qu'en 1954 (exception pour le mois d'avril qui est exceptionnellement chaud et sec en 1954). Les tableaux suivants (XIV et XV) reflètent d'ailleurs les conditions météorologiques régissant ces deux années d'expériences. On peut donc fort bien concevoir qu'en 1954, année plus froide, plus pluvieuse et moins ensoleillée, la croissance des fruits soit plus longue d'environ 3 semaines pour atteindre le même stade de maturité, que cette maturité ne peut être atteinte que plus tard dans l'année ; et qu'au point de vue composition :

1° Les fruits soient plus gros, l'arbre ayant disposé d'une hauteur d'eau plus grande d'une part, l'évaporation étant moindre du fait de la température plus basse et d'une insolation plus faible d'autre part et aussi du fait que les fruits sont restés sur l'arbre 20 jours de plus.

2° La répartition des acides soit différente d'une année à l'autre, l'acide malique étant, dans la poire comme dans le raisin, plus rapidement brûlé les années chaudes que les années froides, ce qui expliquerait

TABLEAU XIV

Météorologie 1950

Mois	Hauteur d'eau mm	Température moyenne à 2 m sous abri				Insolation en heures				Fraction d'insolation			
		1re Décade	2e Décade	3e Décade	Mensuelle	1re Décade	2e Décade	3e Décade	Mensuelle	1re Décade	2e Décade	3e Décade	Mois
Mars	21,5	6°98	9°53	9°68	8°76	73,7	31,8	63,6	169,1	0,66	0,27	0,46	0,46
Avril	46,2	9°83	8°02	8°87	8°91	54,3	49,3	68,4	172,0	0,42	0,36	0,48	0,42
Mai	40,9	11°35	14°97	15°05	13°83	70,8	83,3	51,6	205,7	0,48	0,55	0,30	0,44
Juin	22,7	19°36	16°90	17°70	17°99	88,8	45,2	52,7	186,7	0,56	0,28	0,33	0,39
Juillet	28,9	18°66	18°16	18°92	18°59	58,8	67,4	56,7	182,9	0,37	0,43	0,34	0,38
Août	70,5	17°96	16°94	17°73	17°55	61,9	78,8	49,7	190,4	0,42	0,55	0,33	0,43
Septembre	56,5	16°27	14°85	12°94	14°69	34,4	30,5	31,0	95,9	0,26	0,24	0,26	0,25
Octobre	52,0	13°69	11°98	8°67	11°36	28,8	44,8	24,5	98,1	0,25	0,42	0,22	0,29

TABLEAU XV

Météorologie 1954

Mois	Hauteur d'eau mm	Température moyenne à 2 m sous abri				Insolation en heures				Fraction d'insolation			
		1re Décade	2e Décade	3e Décade	Mensuelle	1re Décade	2e Décade	3e Décade	Mensuelle	1re Décade	2e Décade	3e Décade	Mois
Mars	54,6	7°01	8°84	9°55	8°50	25,1	41,6	34,7	101,4	0,22	0,35	0,25	0,28
Avril	15,0	8°48	7°80	10°18	8°82	61,2	96,2	111,5	268,9	0,47	0,71	0,78	0,66
Mai	33,0	10°34	12°78	13°10	12°11	54,8	43,1	35,2	133,1	0,37	0,28	0,20	0,28
Juin	38,0	14°11	15°53	14°39	14°68	28,8	54,9	37,0	120,7	0,18	0,34	0,23	0,25
Juillet	39,5	13°58	16°02	16°41	15°37	39,7	42,8	61,8	144,3	0,25	0,27	0,37	0,30
Août	90,6	18°24	15°45	15°32	16°30	37,7	37,5	70,7	145,9	0,25	0,26	0,47	0,33
Septembre	53,9	17°12	15°08	12°54	14°91	37,3	36,9	40,9	115,1	0,28	0,29	0,34	0,30
Octobre	30,0	14°28	14°48	13°03	13°90	42,8	50,8	28,3	121,9	0,38	0,47	0,25	0,37

que la poire récoltée en 1954 est plus riche en acide malique que celle de 1950, la température étant un facteur important pour la régulation du travail des enzymes concourant à l'élaboration et au métabolisme des acides organiques du fruit. On remarquera également que si l'acidité de titration est légèrement inférieure en fin de croissance pour l'année 1954, en compensation l'alcalinité des cendres est plus élevée (46 au lieu de 26) si bien qu'au total, on arrive pour les deux années à une somme des cations identique. Il faudrait évidemment répéter cette expérience pour pouvoir donner à cette constatation une explication purement climatique.

TABLEAU XVI

Météorologie

Normales de Rennes.

Calculées par M. MORICE sur les moyennes des années 1879 à 1926 inclus

	Pluie mm	Température
Mars	48,29	7°39
Avril	51,53	10°03
Mai	52,60	13°62
Juin	56,45	16°40
Juillet	55,78	18°25
Août	51,67	18°16
Septembre	50,45	15°68
Octobre	80,11	11°35

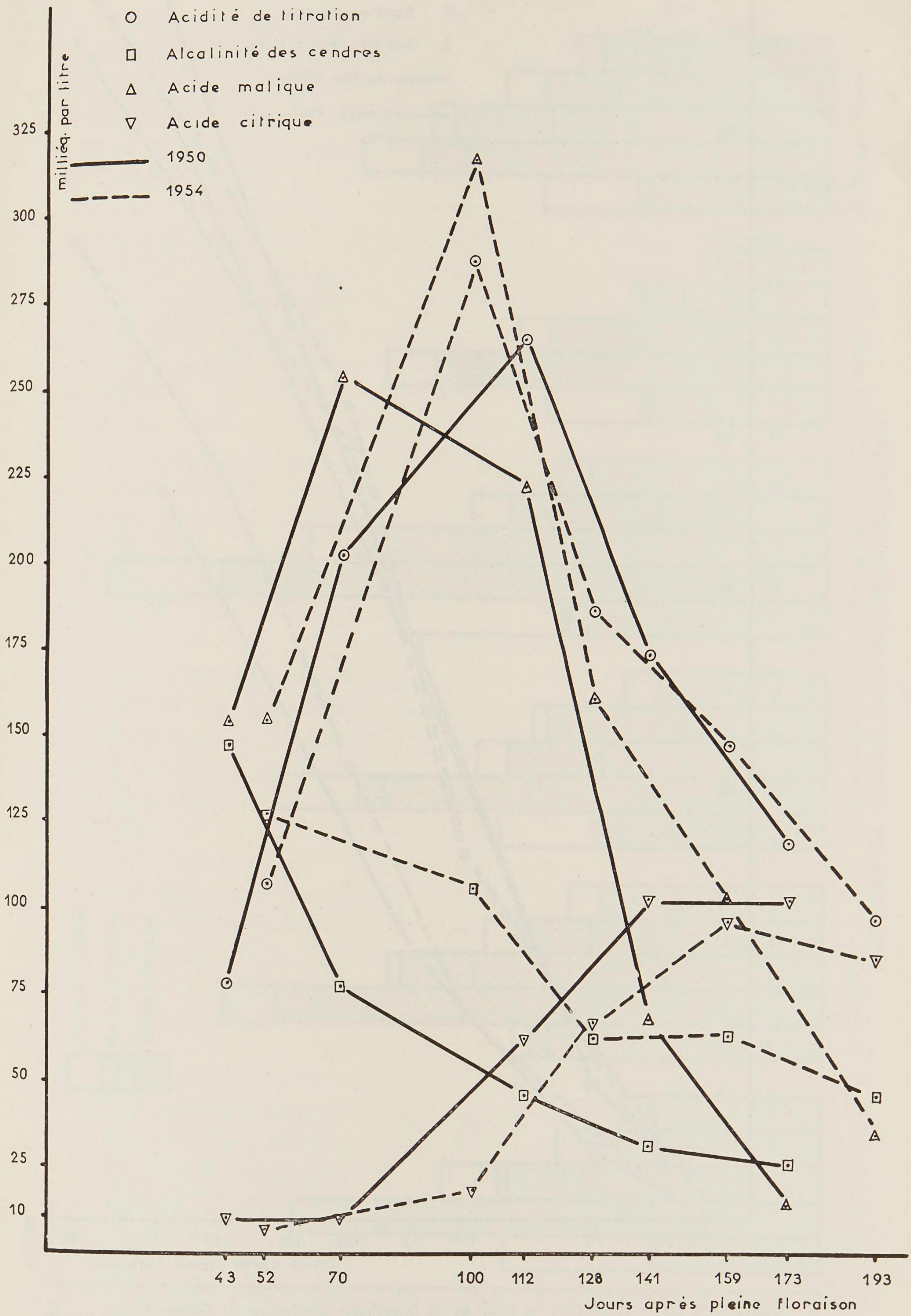
3° Si l'on constate une même richesse saccharine totale en fin de maturation pour les deux années considérées, il faut cependant noter que cette teneur n'est atteinte en 1954 qu'après une durée de croissance plus longue de 20 jours, et à une date située un mois plus tard dans l'année, de sorte qu'en 1954 les fruits ont profité d'un mois d'octobre relativement chaud (température moyenne mensuelle 13°90 pour une normale de 11°30) pour parfaire leur maturité et accroître leur richesse saccharine.

Les graphiques n° I et II confrontant les données analytiques des deux années pour ces principaux éléments du fruit illustrent clairement ces variations, reflets des différences d'activité du fruit : migration et respiration régies par les facteurs extérieurs toujours différents d'une année à l'autre, de sorte qu'il est normal que le reflet de ces facteurs extérieurs obtenu par l'analyse du fruit ne soit jamais rigoureusement le même d'une année à l'autre.

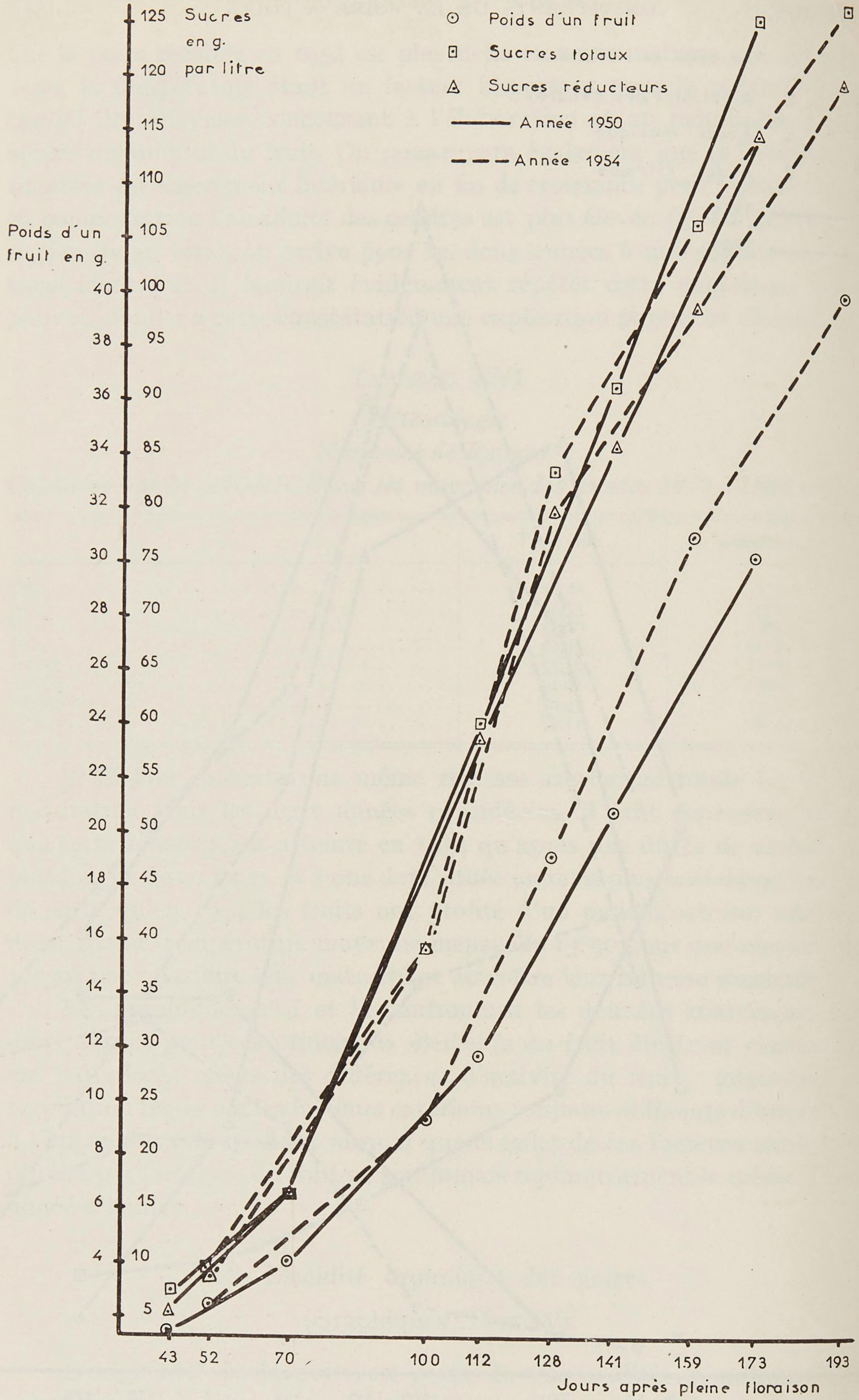
2. L'acidité organique des poires

(Graphiques III et IV)

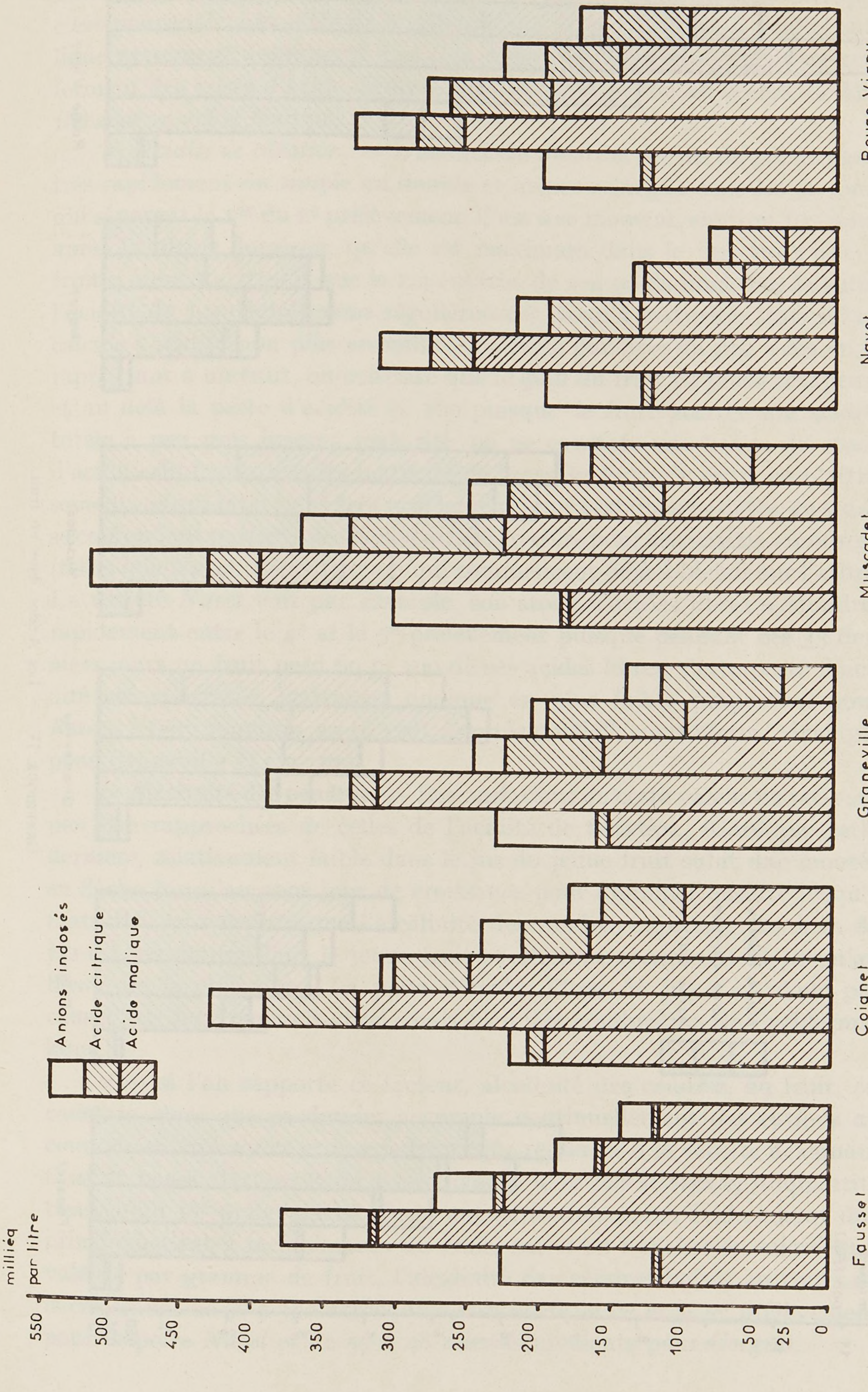
L'originalité de la poire au point de vue acidité organique étant constituée par le fait que ce fruit présente suivant la variété des teneurs très variables en acide citrique, nous avons jugé préférable de porter



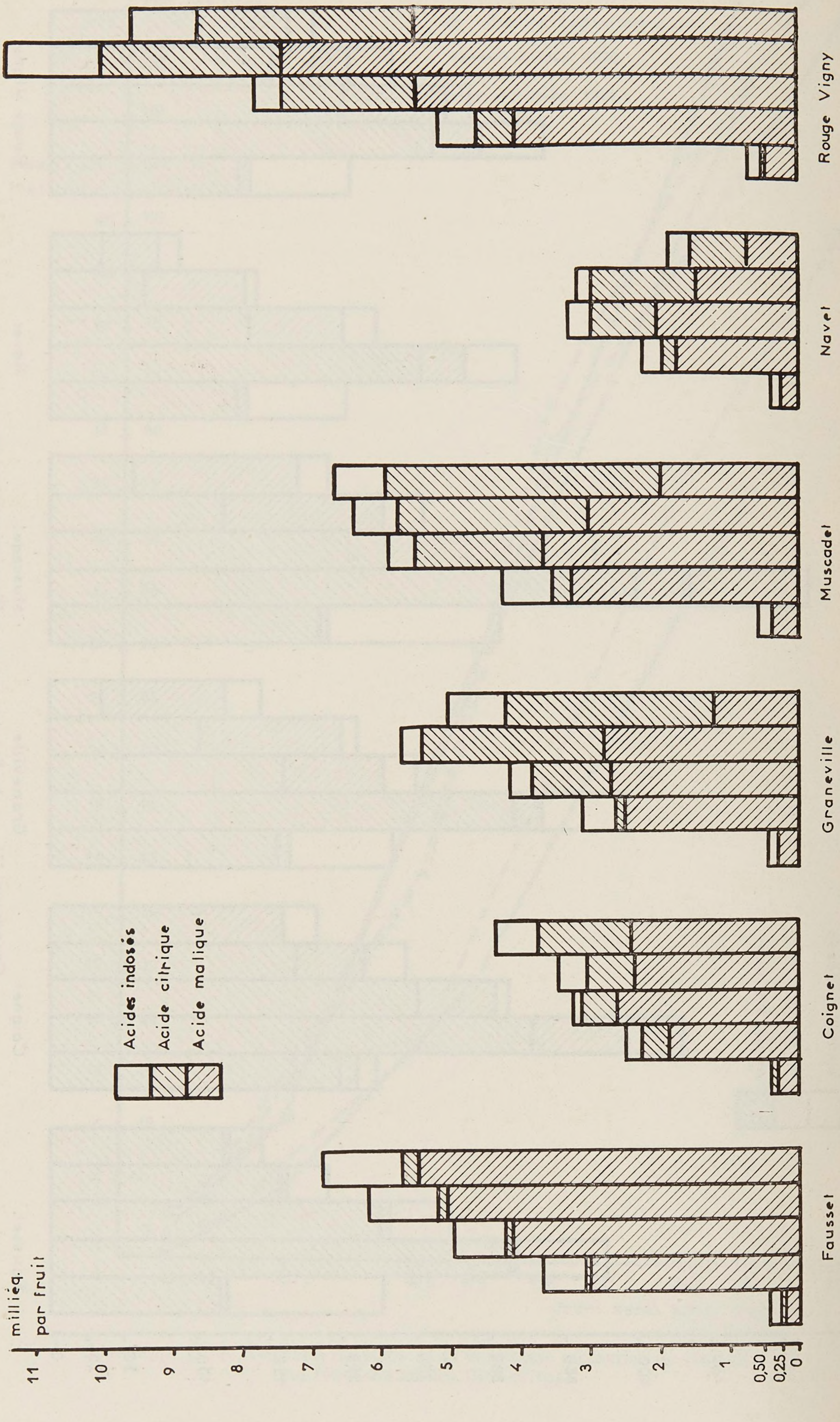
GRAPHIQUE I. — Évolution de l'Acidité de *Graneville* au cours des années 1950 et 1954.



GRAPHIQUE II. — Évolution du poids et de la richesse saccharine de *Graneville* au cours des années 1950 et 1954.



GRAPHIQUE III. — Acidité des jus en milliéquivalents par litre.



GRAPHIQUE IV. — Les Acides dans un fruit.

notre intérêt plus particulièrement sur les variétés riches en acide citrique, c'est pourquoi nous n'avons étudié qu'une poire (*Fausset*) à acidité malique nettement dominante. Les cinq autres variétés expérimentées renferment des doses d'acide citrique variant de la moitié au double de leur richesse en acide malique.

a) *Acidité de titration.* — L'acidité de titration du jus de poires passe très rapidement du simple au double et même au triple dans les 50 jours qui séparent le 1er du 2^{e} prélèvement. C'est à ce moment, environ 100 jours après la pleine floraison, qu'elle est maximum dans le jus, alors que le fruit n'a encore atteint que le 1/4 environ de son poids final. Par la suite, l'acidité du jus décroît assez régulièrement jusqu'à maturité. Mais si l'on calcule l'acidité non plus en milliéquivalents par litre de jus, mais en la rapportant à un fruit, on constate que le gain du fruit en poids compense et au delà la perte d'acidité p. 100 puisque le fruit accroît son acidité totale à peu près jusqu'à maturité, on ne constate une baisse du stock d'acidité du fruit qu'après maturité de brassage lorsqu'il entre en blettissement, ce qui intervient très rapidement pour certaines variétés, ce stade se confondant parfois avec la maturité de récolte pour les variétés « tendres » (telles que *Navet, Rouge Vigny*) qui commencent déjà à blettir sur l'arbre. La variété *Navet* voit par exemple, son stock d'acides libres s'effondrer rapidement entre le 4^{e} et le 5^{e} prélèvement puisque pendant ces 33 derniers jours un fruit perd 60 p. 100 de ses acides libres. Cette perte d'acidité est constatée également quoique en plus faible proportion pour *Rouge Vigny* (environ 20 p. 100) récoltée partiellement blette, ainsi que pour Graneville (14 p. 100).

b) **Alcalinité des cendres.** — Les variations de cette valeur ne peuvent pas être rapprochées de celles de l'acidité de titration. Alors que cette dernière, relativement faible dans le jus du jeune fruit subit une montée en flèche jusqu'au 100^{e} jour de croissance pour diminuer ensuite jusqu'à maturité, on constate que l'alcalinité des cendres exprimée par litre de jus est maximum dans le jeune fruit et diminue constamment jusqu'au terme de la croissance. La perte d'acides libres du jus n'est donc pas causée par leur neutralisation, mais bien par combustion de l'acide malique.

Mais si l'on rapporte ce facteur, alcalinité des cendres, au fruit, on constate alors que ce dernier accumule continuellement des cations au cours de sa croissance et que le fruit mûr renferme à la récolte des quantités de bases atteignant de 4 fois (*Navet*) à 10 fois (*Coignet*) la quantité trouvée au 1er prélèvement. Cette augmentation étant évidemment due principalement à la croissance du fruit, car si on l'évalue en microéquivalents par gramme de fruit, l'alçalinité des cendres baisse au cours de la croissance de 90 à 31 microéquivalents entre le 1er et le 5^{e} prélèvement pour la poire *Navet* et de 57 à 48 microéquivalents pour *Coignet*.

c) **Acide malique.** — Que l'on suive n'importe quelle variété de poires, à acidité malique ou à acidité citrique dominante ou équilibrée sensiblement en ces deux anions, on constate toujours que l'acidité malique augmente rapidement dans le jus pour atteindre son maximum vers la moitié de la vie du fruit, c'est-à-dire vers les 90e à 100e jours après la pleine floraison. Ce maximum étant atteint, la teneur du jus en acide malique baisse fortement jusqu'à la maturité du fruit où on ne retrouve parfois que 10 à 15 p. 100 environ de la concentration maximum dans les poires à acidité citrique, et 30 à 35 p. 100 dans les poires à acidité malique comme *Fausset*.

Si l'on rapporte les teneurs en acide malique au fruit, on s'aperçoit alors que pour « *Fausset* », variété à acidité malique dominante, le fruit augmente constamment sa teneur en acide malique, l'accroissement en poids étant plus important que la diminution de la teneur du jus p. 100. Une poire de cette variété passe ainsi de 0,23 à 5,49 milliéquivalents d'acide malique, alors que pour 1 g de fruit la richesse en acide malique passe de 0,092 milliéquivalent au 1er prélèvement à 0,265 au 2e prélèvement pour retomber à 0,103 milliéquivalent au dernier prélèvement.

Pour la variété à acidité citrique dominante, comme « *Muscadet* », le fruit accroît sa teneur en acide malique jusqu'au 3e prélèvement où sa teneur apparaît maximum, avec 3,69 milliéquivalents, c'est également le cas pour « *Navet* ». Les autres variétés atteignent leur maximum au 4e prélèvement, puis il se produit une nette chute du stock d'acide malique jusqu'à maturité, chute pouvant atteindre et même dépasser 50 p. 100 (*Graneville* : 56 p. 100 ; *Navet* : 63 p. 100), la teneur passant respectivement de 2,81 à 1,23 milliéquivalents pour une poire *Graneville*, et de 2,05 à 0,75 milliéquivalents pour une poire « *Navet* ». Si l'on rapporte les teneurs en acide malique à 1 g de fruit, celles-ci varient pour *Muscadet*, par exemple, de 0,148 milliéquivalent au 1er prélèvement, à 0,340 au 2e prélèvement pour retomber à 0,050 milliéquivalent au 5e prélèvement. On obtient des fluctuations du même ordre avec les autres variétés expérimentées.

d) **Acide citrique.** — Dans la variété « *Fausset* » à composition acidimétrique identique à celle des pommes, le jus présente du début à la fin de la croissance une teneur relativement constante en acide citrique : 3,45 à 4,40 milliéquivalents par litre, avec un maximum de 5,76 milliéquivalents par litre au 3e prélèvement. La composition du jus en acide citrique restant pratiquement inchangée, la teneur totale d'une poire en acide citrique augmente constamment, au cours de sa croissance, proportionnellement à son poids.

Pour les autres variétés, à acidité citrique finale dominante comme *Graneville*, *Muscadet*, *Navet*, ou importante comme *Coignet* et *Rouge Vigny*, le jus présente une faible acidité citrique dans le jeune fruit, 5 à 12 milliéquivalents par litre, pour une acidité malique de 100 à 200 milli-

équivalents, donc un rapport $\frac{\text{Acide malique}}{\text{Acide citrique}}$ très élevé allant de 16,2 (*Coignet*) à 37,0 (*Muscadet*). Au cours de la croissance, la richesse en acide citrique s'accroît rapidement, et continue à s'accroitre lorsque l'acide malique est en voie de régression, pour atteindre son maximum soit au 2e prélèvement (*Coignet*), au 3e prélèvement (*Rouge Vigny*), au 4e (*Navet, Graneville*) ou au dernier prélèvement (*Muscadet*). Le rapport final $\frac{\text{Acide malique}}{\text{Acide citrique}}$ devient alors très faible, la disparition de l'acide malique étant beaucoup plus marquée que celle de l'acide citrique lorsque celle-ci se produit. On obtient ainsi pour ce rapport final des valeurs variant de 0,41 (*Graneville*) à 1,80 (*Coignet*).

La teneur totale d'une poire en acide citrique s'accroît fortement au cours de sa croissance, la disparition de cet anion étant faible, lorsqu'elle se produit, on peut passer ainsi d'une teneur de 0,011 milliéquivalent pour *Muscadet* à 3,96 milliéquivalents par fruit ; on ne constate une forte régression que pour « *Navet* » qui est blet au 5e prélèvement et dont la teneur en acide citrique tombe de 1,50 à 0,82 milliéquivalent par fruit du 4e au 5e prélèvement. Cet acide est donc fortement attaqué au cours du phénomène de blettissement et ceci dans les mêmes proportions que l'acide malique qui passe dans cette même période de 1,48 à 0,75 milliéquivalent.

e) **Acides organiques indosés.** — Si l'on compare la somme des cations (acidité de titration + alcalinité des cendres) à la somme acide malique + acide citrique pour ces différentes variétés de poires, on peut observer en règle générale que la différence entre ces deux sommes diminue au fur et à mesure de la croissance du fruit, l'écart, assez important au 1er prélèvement, puisqu'il atteint et peut même dépasser 100 milliéquivalents par litre de jus, n'est plus que de l'ordre d'une vingtaine de milliéquivalents par litre (13 à 23,5) au dernier prélèvement. Il s'élève en valeur relative entre 9 p. 100 (*Rouge Vigny*) et 16,2 p. 100 (*Fausset*) de la somme des cations. Le tableau XVII rassemble les variations de la différence entre la somme des cations et la somme acide malique + acide citrique au cours de la croissance du fruit, exprimées en milliéquivalents par litre.

Cette proportion finale de 10 à 15 p. 100 d'acides indosés peut s'expliquer au moins partiellement par les travaux de TANNER et RENTSCHLER (4) qui ont trouvé dans les poires à poiré suisses, une teneur constante d'acide chlorogénique s'élevant en moyenne à 1 g par litre, cette évaluation ayant été faite par chromatographie sur papier. Ces auteurs n'ont constaté dans les poires suisses que des traces d'acide quinique et pas du tout d'acide caféique, à moins que les jus n'aient été traités aux enzymes de clarification et de filtration. Dans ce cas, ces préparations enzyma-

tiques contiennent, en plus de la pectine-glycosidase, d'autres enzymes dont des estérases qui sont suffisamment actives pour saponifier l'acide chlorogénique naturel du jus et le scinder en ces deux constituants : acides quinique et caféique qui sont alors décelables par chromatographie sur papier, en plus ou moins grande quantité selon la richesse de la préparation enzymatique utilisée en estérases et suivant la durée de contact.

TABLEAU XVII

Variétés	Prélèvements :					
	nº 1	nº 2	nº 3	nº 4	nº 5	
Fausset	227	379	273,5	192	145	Somme des cations.
	119,5	317,1	232,7	162,4	121,5	Somme acide malique + acide citrique.
	– 107,5	– 61,9	– 40,8	– 29,6	– 23,5	Acides indosés.
Coignet	222,2	431	313,5	242	182,5	Somme des cations.
	210,2	396,2	303,4	213,2	159,6	Somme acide malique + acide citrique.
	– 12	– 34,8	– 10,1	28,8	– 22,9	Acides indosés.
Graneville	234,2	392	249	210	143	Somme des cations.
	162,9	334,8	227,6	198,8	120	Somme acide malique + acide citrique.
	– 71,3	– 57,2	– 21,4	– 11,2	– 23	Acides indosés.
Muscadet	308	518	373	255	191	Somme des cations.
	190	435,5	338,4	228,8	170,8	Somme acide malique + acide citrique.
	– 118	– 82,5	– 34,6	– 26,7	– 20,2	Acides indosés.
Navet	202,5	319	223,5	143	89	Somme des cations.
	135,2	283,5	199,8	135	75,7	Somme acide malique + acide citrique.
	– 67,3	– 35,5	– 23,7	– 8	– 13,3	Acides indosés.
Rouge Vigny	205,5	327	287	233	179,5	Somme des cations.
	137,8	293,8	270	204,4	163,2	Somme acide malique + acide citrique.
	– 67,7	– 33,2	– 17	– 28,6	– 16,3	Acides indosés.

TANNER et RENTSCHLER, ayant également constaté que les pommes renferment toujours de l'acide chlorogénique, et en plus de l'acide quinique, il est très probable, étant donné que les poires à poiré françaises sont souvent beaucoup plus acides que les suisses, que la plus grande partie des acides indosés en fin de croissance soit constituée par de l'acide chlorogénique.

f) **Réaction pH.** — Dans le jeune fruit, le pH du jus est assez élevé, ce qui est d'ailleurs normal puisque l'acidité de titration est, à ce stade, relativement faible, alors qu'il existe par contre une forte teneur en acides salifiés (alcalinité des cendres élevée). Puis la réaction pH subit une chute rapide et marquée, en liaison avec l'augmentation de l'acidité de titration du jus. Le pH se situe à sa valeur minimum au 3e prélèvement, alors qu'une partie de l'acide malique est déjà disparue. Puis il se produit ensuite une évolution en sens contraire, mais nettement moins marquée, de sorte qu'au cours des deux derniers mois de la vie du fruit sur l'arbre le pH remonte d'environ 0,3 à 0,5 unité, mais ne retrouve jamais sa valeur maximum observée au premier prélèvement, alors que l'acidité finale du jus est souvent inférieure à son acidité initiale, et l'alcalinité des cendres toujours nettement plus faible en fin de croissance qu'au début.

3. Les glucides : saccharose, glucose, lévulose
(Graphiques V et VI)

La poire à poiré renferme à maturité les trois sucres : lévulose, glucose et saccharose, ainsi que la pomme à cidre, mais à des concentrations un peu différentes. La poire à poiré renferme proportionnellement plus de lévulose et moins de saccharose que la pomme à cidre.

Les sucres totaux et les sucres réducteurs augmentent à peu près régulièrement dans le jus au cours de la croissance : cette augmentation est plus lente au début de la croissance, jusqu'au 2[e] prélèvement, puis elle devient maximum jusqu'au 4[e] prélèvement, et tend ensuite à se ralentir jusqu'à maturité, mais les conditions climatiques jouent peut-être à ce dernier stade un rôle prépondérant.

Le saccharose, qui n'existe qu'à de très faibles doses au début de la vie du fruit, puisque pour certaines variétés on ne le décèle plus par polarimétrie ou seulement en quantités presque négligeables au 2[e] et au 3[e] prélèvement s'accroît généralement jusqu'à maturité. Le glucose présente souvent lui aussi, des teneurs pratiquement négligeables dans le jeune fruit, puis s'accroît au cours du développement des fruits et se présente, à la maturité, en quantités toujours supérieures au saccharose. Le lévulose est toujours, en cours de croissance, le sucre prédominant et de beaucoup. On peut dire que dans les jeunes fruits on ne rencontre guère que du lévulose. A maturité, il est toujours le sucre dominant, mais du fait de l'apparition du glucose et du saccharose en quantités croissant au cours du développement du fruit, on peut dire que le rapport lévulose/sucres totaux diminue tout au long de la croissance du fruit pour se fixer à maturité à une valeur moyenne d'environ 70 p. 100, ainsi que le montre le tableau XVIII.

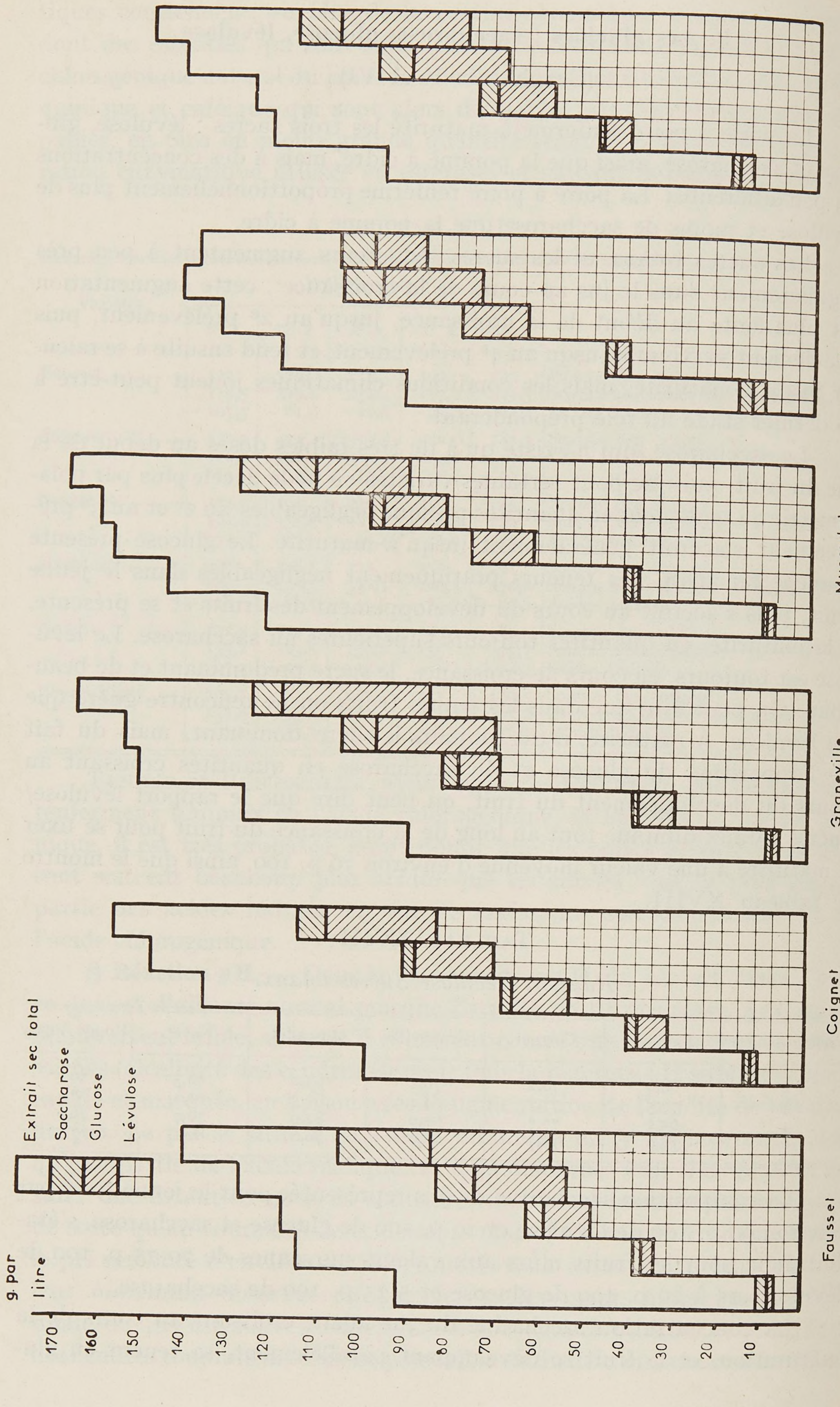
TABLEAU XVIII

Rapport Lévulose/Sucres totaux.

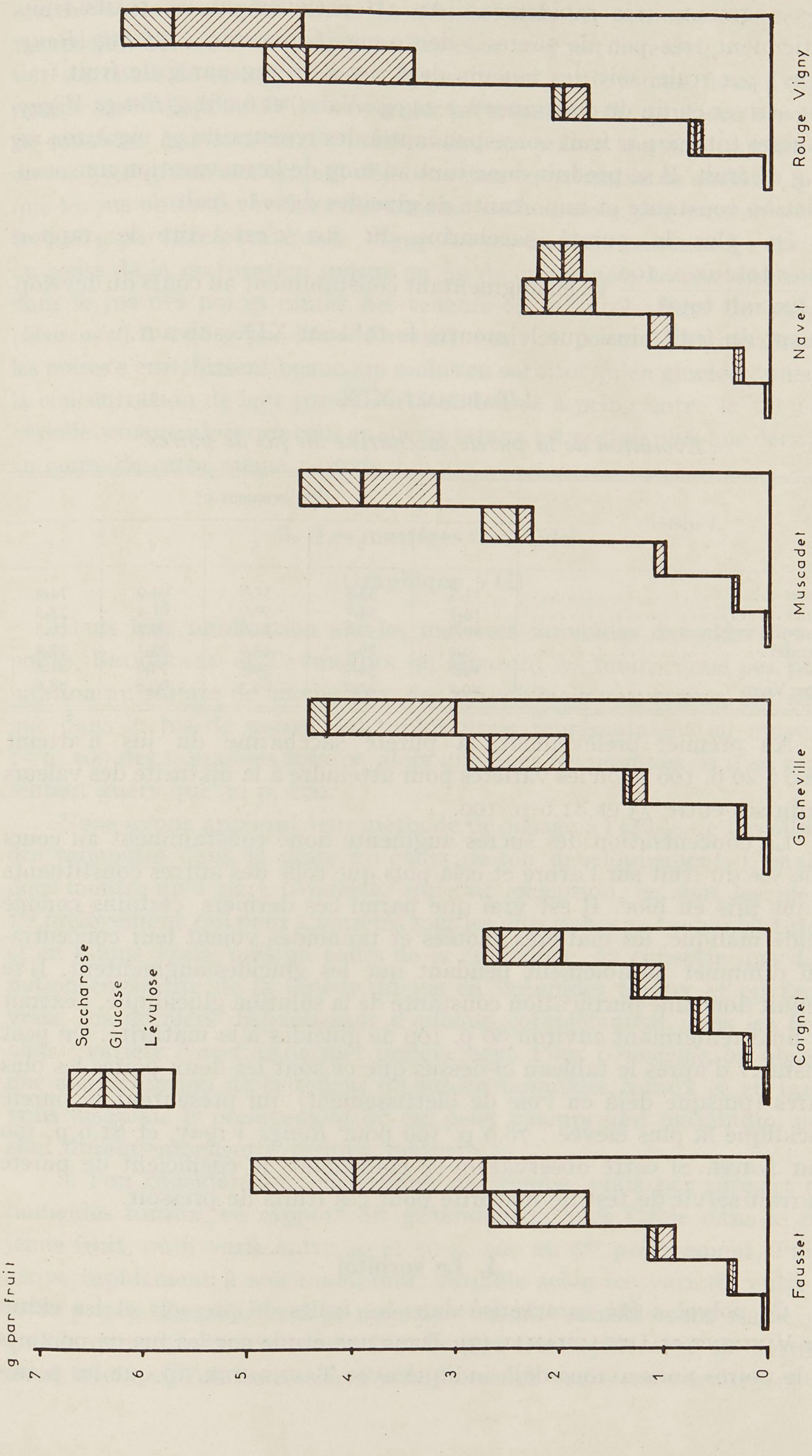
Prélèvement n°	Fausset	Coignet	Graneville	Muscadet	Navet	Rouge Vigny
2	88,6	78,2	78,2	94,0	88,5	86,0
3	77,5	77,7	84,4	91,3	81,4	78,1
4	65,1	77,7	67,0	82,9	70,7	70,6
5	54,6	72,7	68,0	70,6	82,1	67,5

La composition saccharine du jus représentée pour le jeune fruit par environ 90 p. 100 de lévulose et 10 p. 100 de glucose et saccharose, s'établit donc pour les fruits mûrs aux valeurs moyennes de 70-75 p. 100 de lévulose, 15 à 20 p. 100 de glucose et 5-15 p. 100 de saccharose.

La concentration saccharine du jus allant croissant au cours de la maturation, et le fruit se développant parallèlement, sa teneur en glu-



GRAPHIQUE V. — Extrait sec et Glucides dans les jus de Poires.



GRAPHIQUE VI. — Les Glucides dans le fruit.

cides augmente très rapidement. Au 1er prélèvement les petits fruits contiennent très peu de sucres : de 19 mg (*Graneville*) à 75 mg (*Rouge Vigny*) par fruit, soit des teneurs de 8 mg à 16 mg par g de fruit frais pour arriver en fin de croissance à 2,243 g (*Navet*) et 6,281 g(*Rouge Vigny*) de sucres totaux par fruit correspondant à des teneurs de 95 mg à 104 mg par g de fruit. Il se produit donc tout au long de la maturation une accumulation constante et importante de glucides dans le fruit.

De plus la pureté saccharine du jus c'est-à-dire le rapport $\frac{\text{Sucres totaux} \times 100}{\text{Extrait total}}$ va en augmentant constamment au cours du développement du fruit ainsi que le montre le tableau XIX suivant.

TABLEAU XIX

Évolution de la pureté saccharine du jus de poires

Variétés	Prélèvement n°				
	1	2	3	4	5
Fausset	11,3	33,5	52,8	64,9	74,9
Coignet	14,1	34,2	50,6	61,4	73,3
Graneville	10,6	30,8	54,6	69,7	76,3
Muscadet	9,0	29,2	43,9	63,1	77,0
Navet	19,0	39,6	59,5	74,7	81,6
Rouge Vigny	20,2	40,2	60,3	69,8	78,6

Au premier prélèvement, la pureté saccharine du jus n'atteint que 9 à 20 p. 100 selon les variétés pour atteindre à la maturité des valeurs comprises entre 73 et 81,6 p. 100.

La concentration des sucres augmente donc constamment au cours de la vie du fruit sur l'arbre et cela plus que celle des autres constituants du jus pris en bloc. Il est vrai que parmi ces derniers, certains comme l'acide malique, les matières azotées et tannoïdes voient leur concentration diminuer notablement pendant que les glucides augmentent. Il se produit donc une purification constante de la solution glucidique, l'extrait sec final renfermant environ 80 p. 100 de glucides à la maturité. On peut constater d'après le tableau ci-dessus que ce sont les deux poires les plus mûres (puisque déjà en voie de blettissement) qui présentent la pureté glucidique la plus élevée : 78,6 p. 100 pour *Rouge Vigny*, et 81,6 p. 100 pour *Navet*. Si cette observation se confirmait, le coefficient de pureté pourrait servir de test de maturité pour ces fruits de pressoir.

4. Le sorbitol

Ce polyol a été caractérisé dans les fruits de pressoir et les cidres par VINCENT et DELACHANAL (5). Dans une étude sur les jus de pommes et de poires nous avions déjà indiqué avec TAVERNIER (6) que les poires

étaient nettement plus riches en sorbitol que les pommes et que leur teneur pouvait atteindre et même dépasser 20 g par litre de jus.

Au cours de ces expériences, étant limités par le temps, nous n'avons dosé le sorbitol qu'au 1er et au dernier prélèvement. Ce qui nous a permis de constater que lors du 1er prélèvement les jeunes fruits ne pesant que de 2 à 5 grammes renferment déjà une dose appréciable de sorbitol, puisque les jus obtenus révèlent des teneurs variant de 9,32 g pour *Muscadet* à 16,16 g par litre pour *Rouge Vigny*. Le jus du fruit continue à s'enrichir au cours de la maturation puisqu'en fin de croissance, nous avons décelé dans le jus des poires mûres des teneurs en sorbitol allant de 15,30 g (*Muscadet*) à 23,8 g par litre (*Fausset*). Mais au cours de leur croissance les poires s'enrichissent beaucoup moins en sorbitol qu'en glucides, puisque la concentration de leur jus en sorbitol double à peine entre le 1er et le 5e prélèvement, alors que celle en sucres totaux est parfois plus que décuplée au cours de cette même période.

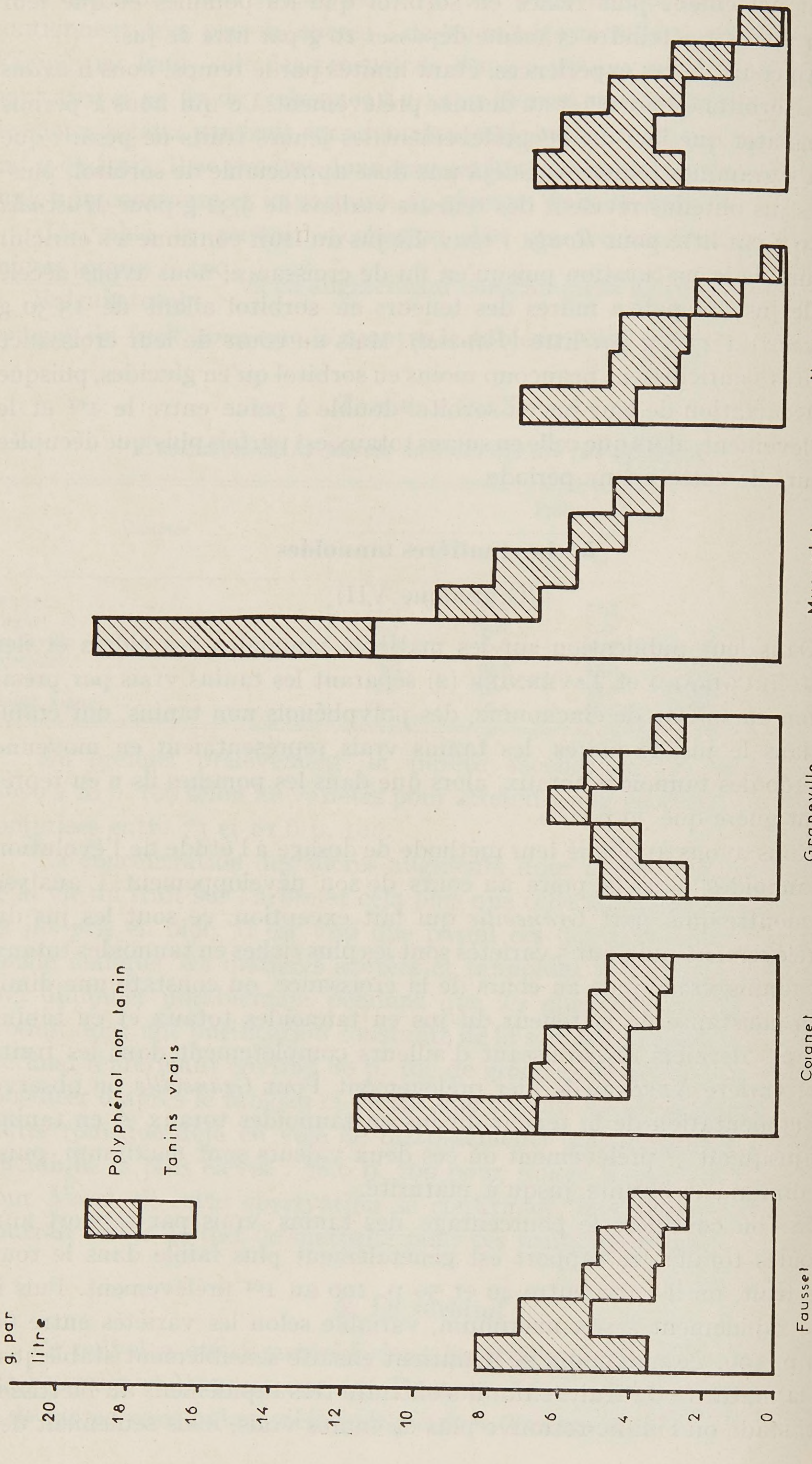
5. Les matières tannoïdes

(Graphique VII)

Dans leur publication sur les matières tannoïdes des cidres et des poirés, BRUGIRARD et TAVERNIER (2) séparant les tanins vrais par précipitation au sulfate de cinchonine, des polyphénols non tanins, ont établi que dans le jus de poires, les tanins vrais représentaient en moyenne 75 p. 100 des tannoïdes totaux, alors que dans les pommes ils n'en représentent guère que 30 p. 100.

Nous avons appliqué leur méthode de dosage à l'étude de l'évolution des tannoïdes dans la poire au cours de son développement. L'analyse nous montre qu'à part *Graneville* qui fait exception, ce sont les jus du 1er prélèvement qui pour 5 variétés sont les plus riches en tannoïdes totaux et en tanins vrais, puis au cours de la croissance, on constate une diminution constante de la teneur du jus en tannoïdes totaux et en tanins vrais, ces derniers disparaissant d'ailleurs complètement dans les fruits blets : variété *Navet* au dernier prélèvement. Pour *Graneville*, on observe une augmentation de la teneur du jus en tannoïdes totaux et en tanins vrais jusqu'au 3e prélèvement où ces deux valeurs sont maximum, puis, elles diminuent ensuite jusqu'à maturité.

Si l'on considère le pourcentage des tanins vrais par rapport aux tannoïdes totaux, ce rapport est généralement plus faible dans le tout jeune fruit, où il varie entre 40 et 50 p. 100 au 1er prélèvement. Puis il arrive rapidement à son maximum, variable selon les variétés entre 60 et 80 p. 100. Ce maximum se maintient ensuite sensiblement stable jusqu'à la maturité du fruit, enfin il s'effondre très rapidement au blettissement, stade où l'on ne retrouve plus de tanins vrais, mais seulement des



GRAPHIQUE VII. — Substances Tannoïdes du jus de Poires.

polyphénols non tanins. Le blettissement exerce donc sur la poire le même effet que le cuvage de la pulpe râpée à l'air qui provoque une fixation très importante des tannoïdes sur les pulpes, insolubilisation portant surtout sur les tanins vrais qui peuvent être éliminés à 90 p. 100.

Ce sont les tannoïdes et plus particulièrement les tanins vrais qui confèrent aux poires à poiré et à leurs jus, leur amertume et leur astringence caractéristiques. Ces caractères sont d'autant plus marqués que le jus est riche en tanins vrais, ce qui est le cas de *Graneville*, *Muscadet*, *Coignet* et *Fausset* dont le jus obtenu directement sans cuvage est si âpre et astringent qu'il est à peu près imbuvable, et doit être réservé à la distillation. Le cuvage à l'air de la pulpe améliore fortement les qualités gustatives des jus de poires et permet d'obtenir des jus consommables en nature ou des poirés très agréables à saveur vineuse rappelant les petits vins blancs de pays.

Si l'on rapporte les tannoïdes au fruit, on peut constater que de même que pour la plupart des autres constituants, la perte en concentratioı p. 100 dans le jus est plus que compensée par l'augmentation de poids du fruit, et qu'en conséquence le stock des tannoïdes s'accroît continuellement au cours du développement du fruit. Ce stock de tannoïdes ne s'effondre qu'avec le blettissement, où il devient presque négligeable.

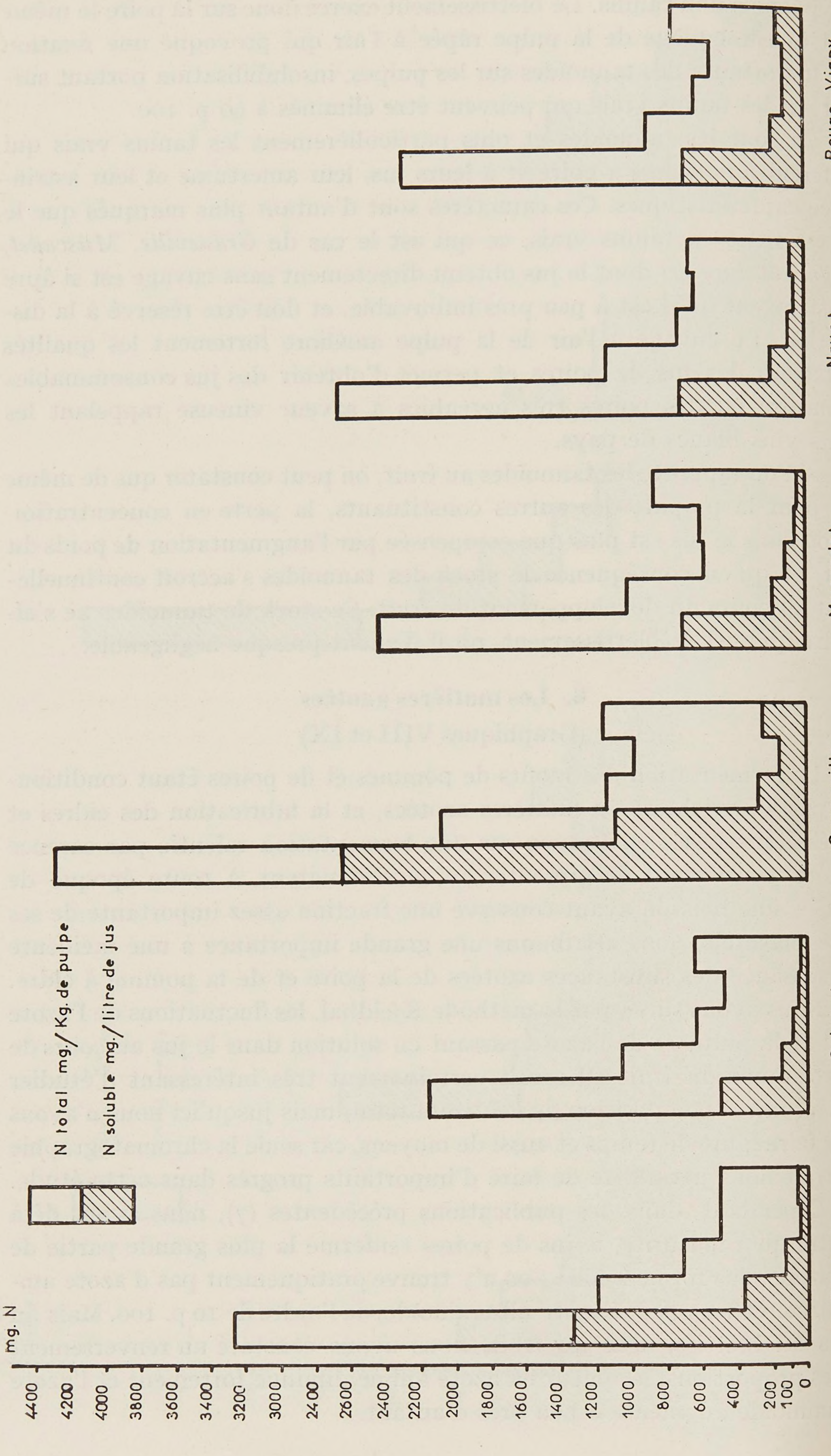
6. Les matières azotées

(Graphiques VIII et IX)

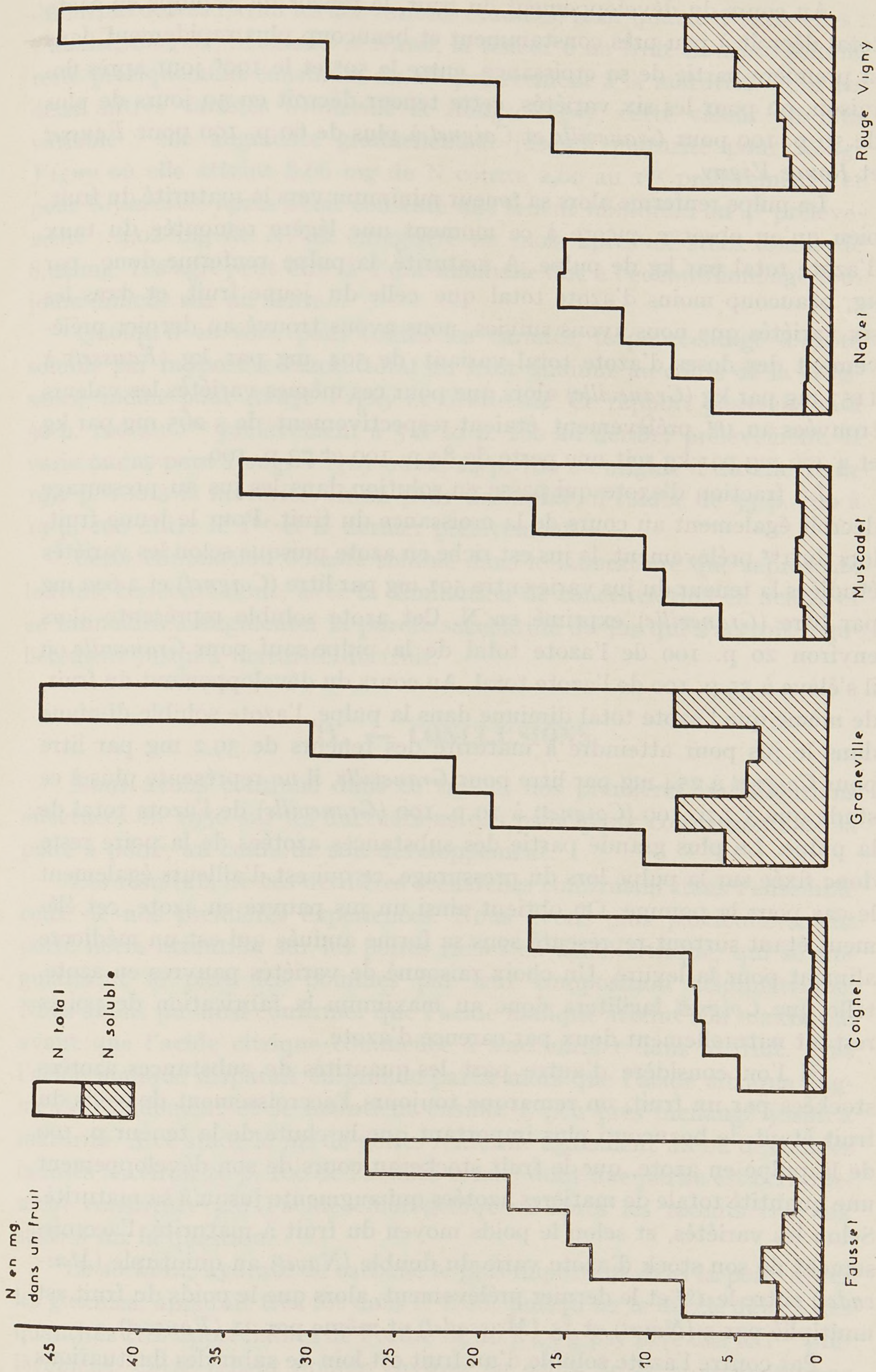
La fermentation des moûts de pommes et de poires étant conditionnée par leur richesse en matières azotées, et la fabrication des cidres et poirés étant basée en France sur une fermentation ralentie par carence d'azote, permettant de présenter au consommateur, à toute époque de l'année, une boisson ayant conservé une fraction assez importante de ses sucres naturels, nous attribuons une grande importance à une meilleure connaissance des substances azotées de la poire et de la pomme à cidre.

Nous avons suivi, par la méthode Kjeldhal, les fluctuations de l'azote total de la pulpe et de l'azote passant en solution dans le jus au cours de la croissance du fruit. Il serait certainement très intéressant d'étudier plus à fond la composition de cet azote total, mais jusqu'ici nous n'avons pu le faire faute de temps et aussi de moyens, car seule la chromatographie pourrait nous permettre de faire d'importants progrès dans cette étude.

Cependant, dans des publications précédentes (7), nous avons déjà montré qu'à maturité, le jus de poires renferme la plus grande partie de son azote sous forme aminé ; on n'y trouve pratiquement pas d'azote ammoniacal et très peu d'azote albuminoïde, de l'ordre de 10 p. 100. Mais au cours du blettissement du fruit, nous avons constaté un renversement de ces proportions, la teneur en azote aminé diminue fortement et l'azote albuminoïde augmente à peu près d'autant.



GRAPHIQUE VIII. — Matières Azotées en milligrammes d'Azote dans la pulpe et le jus.



GRAPHIQUE IX. — Azote dans un fruit.

Au cours du développement du fruit, la teneur de la pulpe en azote total décroît à peu près constamment et beaucoup plus rapidement dans la première partie de sa croissance, entre le 50e et le 100e jour après floraison, où pour les six variétés, cette teneur décroît en 50 jours de plus de 50 p. 100 pour *Graneville* et *Coignet* à plus de 60 p. 100 pour *Fausset* et *Rouge Vigny*.

La pulpe renferme alors sa teneur minimum vers la maturité du fruit, bien qu'on observe encore à ce moment une légère remontée du taux d'azote total par kg de pulpe. A maturité la pulpe renferme donc, par kg, beaucoup moins d'azote total que celle du jeune fruit, et dans les six variétés que nous avons suivies, nous avons trouvé au dernier prélèvement des doses d'azote total variant de 504 mg par kg (*Fausset*) à 1157 mg par kg (*Graneville*) alors que pour ces mêmes variétés les valeurs trouvées au 1er prélèvement étaient respectivement de 3 265 mg par kg et 4 276 mg par kg soit une perte de 84 p. 100 et 73 p. 100.

La fraction d'azote qui passe en solution dans les jus au pressurage décroît également au cours de la croissance du fruit. Pour le jeune fruit, lors du 1er prélèvement, le jus est riche en azote puisque selon les variétés étudiées la teneur du jus varie entre 501 mg par litre (*Coignet*) et 2 642 mg par litre (*Graneville*) exprimé en N. Cet azote soluble représente alors environ 20 p. 100 de l'azote total de la pulpe sauf pour *Graneville* où il s'élève à 55 p. 100 de l'azote total. Au cours du développement du fruit, de même que l'azote total diminue dans la pulpe, l'azote soluble diminue dans le jus pour atteindre à maturité des teneurs de 39,2 mg par litre pour *Coignet* à 254 mg par litre pour *Graneville*, il ne représente plus à ce stade que 5,3 p. 100 (*Coignet*) à 19 p. 100 (*Graneville*) de l'azote total de la pulpe. La plus grande partie des substances azotées de la poire reste donc fixée sur la pulpe lors du pressurage, ce qui est d'ailleurs également le cas pour la pomme. On obtient ainsi un jus pauvre en azote, cet élément étant surtout représenté sous sa forme aminée qui est un médiocre aliment pour la levure. Un choix raisonné de variétés pauvres en azote, telle que *Coignet* facilitera donc au maximum la fabrication de poirés restant naturellement doux par carence d'azote.

Si l'on considère d'autre part les quantités de substances azotées stockées par un fruit, on remarque toujours, l'accroissement de poids du fruit étant de beaucoup plus important que la chute de la teneur p. 100 de la pulpe en azote, que le fruit stocke au cours de son développement une quantité totale de matières azotées qui augmente jusqu'à sa maturité. Selon les variétés, et selon le poids moyen du fruit à maturité, l'accroissement de son stock d'azote varie du double (*Navet*) au quintuple (*Muscadet*) entre le 1er et le dernier prélèvement, alors que le poids du fruit est multiplié par 9 (*Navet*) et 15 (*Muscadet*) et même par 21 (*Fausset*).

Par contre l'azote soluble d'un fruit est loin de subir des fluctuations

du même ordre. Parmi les six variétés étudiées, pour quatre d'entre elles : *Fausset, Coignet, Muscadet et Navet,* la teneur d'un fruit en azote soluble reste pratiquement constante du 1er prélèvement à la maturité. Pour les deux autres variétés *Graneville* et *Rouge Vigny,* cette valeur est plus variable : elle augmente graduellement jusqu'à maturité pour *Rouge Vigny* où elle atteint 8,66 mg de N contre 2,60 au 1er prélèvement ; et pour *Graneville,* après avoir constaté une teneur minimum au 4e prélèvement : 4,02 mg de N, on enregistre un mois après un stock double de 8,94 mg. Il s'agit peut-être là d'une anomalie due à l'échantillonnage toujours difficile sur un arbre.

Quoiqu'il en soit, pour toutes les variétés, le pourcentage d'azote soluble par rapport à l'azote total du fruit diminue au cours de la croissance, même pour *Rouge Vigny* et *Graneville.* Ce rapport passe de 20 à 30 p. 100 au 1er prélèvement à 5 à 10 p. 100 au dernier prélèvement. Il varie moins pour *Rouge Vigny* où de 24 p. 100 à l'origine il est encore de 19,0 p. 100 à la maturité. Enfin pour *Graneville,* il tombe de 55 p. 100 à 19 p. 100 entre le 1er et le dernier prélèvement.

Cette élimination d'azote soluble dans le laboratoire que représente le fruit, concourt donc, avec la diminution de concentration en acides et en tannoïdes à augmenter la pureté saccharine du jus qui s'accroît régulièrement jusqu'à maturité du fruit.

IV. — CONCLUSIONS

Nous avons continué dans ce travail nos premières investigations effectuées en 1950 sur les fluctuations des principaux constituants de la poire à poiré, au cours de son développement.

Les résultats de ces dernières recherches confirment dans l'ensemble ceux de nos premières expériences. Nous avons plus particulièrement porté notre attention sur les poires riches en acide citrique, qui se singularisent le plus des pommes par leur composition acidimétrique. Nous avons pu ainsi confirmer que l'acide malique atteint son maximum avant que l'acide citrique commence à s'accumuler dans le fruit. Puis l'acide malique disparaît en grande partie alors que l'acide citrique augmente rapidement et se maintient ensuite à peu près inchangé jusqu'à maturité. A ce stade le jus de poires renferme également un ou des acides indosés (environ 20 p. 100 de l'acidité totale) dont une partie est certainement constituée par l'acide chlorogénique d'après les récents travaux suisses sur la question.

Le sorbitol, hydrate de carbone le plus important dans la poire après les glucides, apparaît très tôt dans le fruit, puisqu'on le décèle déjà à des quantités très appréciables de l'ordre de 10 à 15 g par litre dès le 1er prélèvement. Cette teneur double environ au cours de la croissance pour

atteindre à maturité, des doses de 15 à 23 g par litre. Cette richesse en sorbitol pourrait peut-être attirer l'attention des spécialistes, en vue de son extraction, le sorbitol étant de plus en plus recherché sur le marché, ses applications se développant continuellement.

Le jus des poires très jeunes, pesant de 2 à 5 g, est déjà très richement pourvu en substances tannoïdes, surtout en polyphénols, puis, par la suite, si la concentration en tannoïdes totaux fléchit au cours de la croissance du fruit, la teneur en tanins vrais tend à augmenter de sorte qu'à maturité ceux-ci représentent 60 à 80 p. 100 des tannoïdes totaux. De par leur composition ces tannoïdes ont un intérêt diététique, ils se rattachent en effet, en partie aux tanins catéchiques et aux flavonols qui manifestent une activité vitaminique P. Les jus de poires et les poirés peuvent donc prétendre, à priori, représenter une source intéressante de vitamine P.

Les matières azotées, auxquelles le technicien attache une grande importance pour la fabrication de boissons conservant naturellement une partie de leurs sucres d'origine, ont été également étudiées au cours de ce travail. Leur concentration relativement élevée dans les jus des jeunes fruits s'abaisse rapidement au cours de la croissance, du fait d'une part de l'appauvrissement continuel de la pulpe en azote total, et d'autre part de l'insolubilisation croissante de l'azote soluble qui, souvent, ne représente plus à maturité que 5 à 10 p. 100 de l'azote total du fruit.

Ainsi que nous l'avons déjà indiqué, nos connaissances du métabolisme de la poire restent, après ce travail, encore bien incomplètes. Il reste encore un travail analytique important à effectuer pour éclaircir les nombreuses énigmes que nous posent les acides, les matières azotées, les tannoïdes de la poire, avant de songer à élucider leur évolution au cours de la croissance du fruit, ce qui nécessite des moyens qui ne sont pas en notre possession.

Nous remercions bien vivement M. MORICE, responsable du poste de météorologie de l'I. N. R. A. à Rennes, qui a bien voulu nous communiquer les rélevés météorologiques que nous présentons dans ce travail, et qui a calculé les normales pour Rennes sur la période 1879-1926 inclus.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) JACQUIN (P.) et TAVERNIER (J.). — *Ann. de Techn. de l'I. N. R. A.*, **3**, 209, 1954.
(2) BRUGIRARD (A.) et TAVERNIER (J.). — *Ann. de Techn. de l'I. N. R. A.*, **1**, 311, 1952.
(3) JACQUIN (P.) et TAVERNIER (J.). — *Ind. Agr. et Alim.*, **68**, 599, 1951.
(4) TANNER (H.) et RENTSCHLER (H.). — *Fruchtsaft Industrie*, **1**, 231, 1956.
(5) VINCENT et DELACHANAL. — *C. R. Ac. Sc.*, **108**, 354, 1889.
(6) TAVERNIER (J.) et JACQUIN (P.). — Fruits et légumes 1955, *Ann. Nut. Alim.*, **9**, 5-6, 143, 1955.
(7) TAVERNIER (J.) et JACQUIN (P.). — *C. R. Ac. Sc.*, **222**, 607, 1946. — *Chim. Ind.*, **58**, 135, 1947.

OXYDATIONS ET RÉDUCTIONS EN CIDRERIE

PAR

R. CREFF

Station de Recherches pomologiques et cidricoles, Rennes.

TROISIÈME MÉMOIRE

LE POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION SA MESURE, SA SIGNIFICATION DANS LES CIDRES ET LES JUS DE POMMES

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

II. — Signification des potentiels Redox dans les boissons et dans les cidres en particulier.

1° Conditions théoriques d'une mesure significative.
2° État des systèmes redox des boissons.
3° Élargissement de la notion de potentiel.
4° Influence de l'oxygène dissous et de l'eau.
5° Importance de la notion de concentration limite.
6° Variation du potentiel en fonction du pH.
7° Cas des cidres et jus de pommes.
8° Conclusion du chapitre.

III. — Observations sur les techniques de mesures des potentiels Redox.

1° Appareillage.
2° Remarques sur les mesures de potentiels redox.
3° Conclusion.

IV. — Potentiels d'oxydo-réduction des cidres.

1° Influence de la fermentation.
2° Interprétation.
3° Influence de l'aération sur les potentiels des cidres.
4° Interprétation.

V. — Potentiels d'oxydo-réduction des jus frais.

1° Influence de l'aération sur le potentiel des jus frais.
2° Interprétation.

VI. — Influence du SO_2 sur les potentiels mesurés ; valeur de ces potentiels.

VII. — **Influence d'additions d'eau oxygénée, de fer et de cuivre sur les potentiels mesurés à l'air.**

VIII. — **Influence d'additions d'acide ascorbique et de réductones sur les potentiels des jus et des cidres.**

IX. — **Potentiels mesurés dans des cidres « framboisés ».**

X. — **Conclusions générales.**

I. — INTRODUCTION

Les phénomènes d'oxydation jouent un très grand rôle en cidrerie où les maladies classiques qui causent les plus gros dégâts doivent être attribuées à l'action directe ou indirecte de l'oxygène de l'air.

Nous avons publié en 1953 (1) une mise au point sur ces maladies, les systèmes réducteurs du cidre et donné quelques résultats préliminaires.

Le potentiel d'oxydo-réduction semble devoir à priori apporter une solution élégante aux divers problèmes d'oxydation et de réduction des boissons. Il a été utilisé par de nombreux chercheurs français et étrangers pour l'étude de ces phénomènes en œnologie et en brasserie. Des études récentes de DEIBNER (2), GRAFF (3), RIBEREAU-GAYON (4) analysent les nombreux travaux parus sur ce sujet.

Pour les cidres et les jus de pommes, les résultats sont rares et pratiquement inexistants, c'est pourquoi nous nous sommes penchés sur cette question.

II. — SIGNIFICATION DES POTENTIELS REDOX DANS LES BOISSONS ET DANS LES CIDRES EN PARTICULIER

1° Conditions théoriques d'une mesure significative,

La notion de potentiel d'oxydo-réduction est rapidement apparue plus compliquée qu'elle ne le semblait à priori et GRAY et STONE (5) travaillant sur les bières concluent à l'inefficacité de ces mesures, qu'ils considèrent comme illusoires, les conditions théoriques ne leur paraissant pas réalisées. KEPES (6) reprend leurs conclusions dans une étude générale sur l'oxydo-réduction dans les fermentations. Elles peuvent se résumer comme suit :

Une mesure stable et précise exige plusieurs conditions :

a) Le système oxydo-réducteur est réversible.

b) Il est en équilibre ou cet équilibre s'établit rapidement.

c) Cet équilibre correspond au palier d'oxydation de système, les mesures étant illusoires sur les branches verticales. Cette condition est réalisée sensiblement pour des quantités de formes oxydées et réduites variant entre 20 et 80 p. 100 du total.

d) Les deux formes doivent être respectivement en équilibre réversible et rapide avec l'électrode en métal noble, le système est électro-actif, il ne se superpose pas de réduction ou d'oxydation du solvant ou de réduction de l'oxygène dissous.

2° Etat des systèmes redox des boissons.

Ces conditions ne sont pas réalisées dans les boissons et en particulier dans le cidre. En effet :

a) Les boissons ne constituent pas des systèmes entièrement réversible par exemple, l'oxydation des tannoïdes est parfaitement irréversible puisqu'il se forme, au-delà de l'équilibre

polyphénols ⇄ quinones

des produits de condensation insolubles des tanins et des colorants appelés phlobaphènes.

L'anhydride sulfureux s'oxyde en donnant du sulfate pratiquement irréductible dans les conditions pratiques. De même si l'équilibre :

acide ascorbique ⇄ acide déhydroascorbique

est théoriquement réversible, l'oxydation par des catalyseurs comme le cuivre est poussée bien plus loin que le stade déhydroascorbique avec clivage de la molécule.

b) L'équilibre des différents systèmes ne s'établit que lentement. On peut citer le cas des réductones qui possèdent à côté d'un pouvoir réducteur rapide, un pouvoir réducteur lent, lié à la transformation de la forme dicétonique en forme diénolique.

c) La complexité des systèmes redox, pour la plupart pratiquement inconnus ne permet pas d'affirmer leur électro-activité. Cette complexité entraîne d'autre part l'existence de potentiels influencés simultanément par deux ou plusieurs systèmes se superposant.

Si l'on admet ces conclusions, la mesure du potentiel redox n'est pratiquement possible que dans des boissons conservées en bouteilles depuis des années, où les systèmes, même lents ont pu s'équilibrer. Cette mesure présente beaucoup d'intérêt dans les vins fins où elle permet de contrôler la formation du bouquet. Elle n'en présente pas pour les cidres où cette question de vieillissement est secondaire, qui ne subissent pas de garde et sont vendus dans l'année de leur fabrication. En particulier, cette mesure ne semble pas intéressante pour l'étude des troubles d'oxydation qui nous intéressent, qui se manifestent quelques heures, quelques jours ou au plus quelques semaines après l'aération accidentelle, les systèmes étant donc en pleine évolution.

Graff (3) et Ribereau-Gayon (4) remarquent que le potentiel dans un vin aéré est un potentiel apparent, puisque l'équilibre n'est pas établi, et que le potentiel limite dans un vin pratiquement en équilibre,

résulte non seulement de la présence des systèmes réversibles, mais de la présence de substances irréversibles. Les conclusions de GRAY et STONE semblent alors parfaitement justifiées, la complexité des phénomènes d'oxydo-réduction devient telle que les mesures deviennent illusoires.

Mais des travaux récents de chimie minérale semblent donner une raison d'être à ces mesures potentiométriques en élargissant la notion de potentiel et en définissant des potentiels autres que ceux précédemment décrits.

3° Élargissement de la notion de potentiel.

M^lle BEZIERS (7) remarque que même en chimie minérale, les systèmes oxydo-réducteurs réversibles sont assez peu nombreux, mais que pour de nombreux systèmes partiellement ou même pratiquement irréversibles on peut mesurer un potentiel stable et reproductible.

La signification thermodynamique de ces potentiels est différente de celle des systèmes réversibles, leur théorie physique encore imparfaite, mais pour M^lle BEZIERS, ils peuvent être pratiquement utilisés dans la prévision des réactions électrochimiques.

Ces potentiels sont moins bien définis, ils ne s'obtiennent qu'à 10 à 20 mV près, alors que ceux des systèmes réversibles se mesurent sans difficultés à 5 mV près.

GAUGUIN (8) distingue expérimentalement trois sortes de potentiels.

a) Les potentiels réversibles. Les corps réagissant sont électroactifs, le potentiel mesuré est le potentiel thermodynamique.

Pour une réaction :

$$m\mathrm{Ox} + ne \rightleftarrows p\ \mathrm{Red}.$$

$$\mathrm{E} = \mathrm{E}_0 + \frac{\mathrm{RT}}{n\mathrm{F}} \log \frac{|\mathrm{O}x|^m}{|\mathrm{Red}|^p}$$

soit

$$\mathrm{E} = \mathrm{E}_0 + \frac{0{,}058}{n} \log \frac{|\mathrm{O}x|^m}{|\mathrm{Red}|^p}$$

b) Les potentiels irréversibles. Les corps ne sont pas tous électroactifs en solution. Le potentiel est lié à l'activité de l'ion électroactif et est différent du potentiel thermodynamique.

c) Les potentiels limites. Il s'agit d'un cas spécial des systèmes réversibles. Au-dessous d'une certaine concentration (10^{-5} M pour Fe^{+++}) l'un des systèmes cesse d'être électroactif. Le potentiel est encore différent du potentiel thermodynamique.

Ces 2 formes de potentiels sont fonction de la concentration du corps électroactif et on a dans les deux cas :

$$\mathrm{E} = \mathrm{A} + \frac{0{,}058}{n} \log |\mathrm{O}x|^m$$

si l'oxydant est seul électroactif.

$$E = B + \frac{0{,}058}{n} \log \frac{1}{|\mathrm{Red}|^p}$$

si le réducteur est seul électroactif.

A et B étant des valeurs différentes de E_0 potentiel normal de la formule relative aux systèmes réversibles.

Enfin, si le système ne comporte que des ions non électroactifs on ne peut mesurer un potentiel défini.

Tous ces potentiels ont été utilisés par ces différents auteurs pour la prévision de réactions électroniques et particulièrement pour la mise au point de méthodes électrochimiques de dosage. Il est évident que si l'on se place sur le plan de la prévision des réactions purement chimiques seuls sont utilisables les potentiels thermodynamiques de systèmes électroactifs répondant à la loi de NERNST, sous réserve que la vitesse de réaction soit suffisante. COURSIER (9) propose pour introduire une grandeur cinétique, l'utilisation des courbes de polarisation pour l'électrode utilisée, les potentiels mesurés ne donnant aucun renseignement sur cette vitesse. Il rappelle d'autre part, les travaux de CONANT qui montrent que dans certains cas la vitesse de réaction d'un système lent avec différents systèmes rapides varient dans le même sens que les potentiels normaux d'équilibre de ceux-ci. Élargissant cette constatation il montre d'autre part, que l'on peut prévoir de façon systématique les réactions d'oxydo-réduction de systèmes lents, si elles sont effectuées en présence d'un système redox intermédiaire rapide. Ceci recoupe les constatations de CHARLOT (10) qui, étudiant les vitesses des réactions d'oxydo-réduction montre que les catalyseurs en accélérant les réactions lentes établissent un potentiel défini.

Les réactions catalytiques et enzymatiques jouant un grand rôle tant dans les réactions biologiques que dans les boissons, on peut admettre que des systèmes très lents, pratiquement irréversibles au sens électrochimique peuvent atteindre des valeurs définies dans de tels milieux, l'établissement de ce potentiel défini étant caractéristique de l'action catalytique ou enzymatique.

Aussi nous concluerons contrairement à GRAY et STONE que les mesures de potentiels d'oxydo-réduction ne sont pas dans les milieux qui nous intéressent totalement illusoires. Il faut simplement trier parmi les chiffres obtenus, ceux qui représentent des systèmes réversibles et rapides, ou des systèmes rendus rapides par catalyse ou action d'une enzyme, des potentiels non thermodynamiques tels que les potentiels mixtes ou à concentration limite. Cette distinction peut s'opérer selon COURSIER par l'utilisation des courbes de polarisation de l'électrode utilisée. Il existe d'ailleurs des moyens plus empiriques d'effectuer ce

triage : le potentiel d'un système oxydo-réducteur rapide aux deux formes électroactives, donc un potentiel thermodynamique, est indépendant de la nature de l'électrode d'après PIONTELLI (cité par COURSIER) ; il suffira donc de déterminer le potentiel d'équilibre avec deux électrodes inattaquables de surfaces actives très différentes pour déceler ces potentiels qui nous intéressent, les potentiels mixtes variant beaucoup avec la nature et la surface de l'électrode.

On peut aussi utiliser la propriété citée par COURSIER des potentiels irréversibles ou mixtes de varier instantanément et d'une valeur importante si l'on agite la solution.

4° Influence de l'O dissous et de l'eau.

Outre son action comme réactif oxydant sur les corps du type réductone et acide ascorbique directement ou par catalyse métallique, sur les polyphénols et tannoïdes par catalyse enzymatique et peut-être métallique, l'oxygène dissous intervient encore dans l'établissement des potentiels limites. On a essayé de définir une électrode d'oxygène analogue à l'électrode d'hydrogène, permettant de définir l'état redox dû à la dissolution d'oxygène et basé sur l'équilibre hypothétique.

$$O_2 + 2H_2O + 4e \rightleftarrows 4\,OH$$

On aurait alors

$$rO_2 = \log \frac{1}{PO_2}$$

PO_2 étant la pression d'oxygène gazeux en équilibre avec l'oxygène dissous. Le ro_2 étant lié au rH_2

$$rH_2 = \log \frac{1}{PH_2}$$

(PH_2 étant la pression hypothétique d'hydrogène gazeux en équilibre avec le système oxydo-réducteur) par la formule :

$$\frac{1}{2}\,rO_2 + rH_2 = 42 \text{ à } 20^{\circ}\text{C.}$$

mais l'électrode d'oxygène est toujours imparfaite et cette notation ne semble être qu'une vue de l'esprit.

COURSIER (9) et DUYCKAERTS (11) utilisant les courbes de polarisation montrent l'influence de l'oxygène dissous et de l'eau sur le potentiel statique.

Si le système redox est réversible et a ses deux formes électroactives, l'eau et l'oxygène dissous n'ont pratiquement pas d'influence, le potentiel s'établit rapidement et suit la loi de NERNST, à condition que les concentrations des 2 formes soient supérieures à la concentration limite. Dans le cas contraire on retrouve le potentiel limite de GAUGUIN (8).

Si le réducteur est seul électro-actif, le potentiel mesuré est un potentiel mixte. L'oxygène dissous joue le rôle de l'oxydant, le potentiel mesuré devient fonction du logarithme de la concentration de l'oxygène dissous et est indépendant de la concentration de la forme oxydée. L'exemple classique d'un tel potentiel est le système cystéine/cystine où seule la cystéine est électroactive par rapport à l'électrode de métal noble.

Dans un milieu dépourvu d'oxygène on retombe sur le cas classique du potentiel irréversible de GAUGUIN (8)

$$E = B + \frac{0{,}058}{n} \log \frac{1}{|Red|^p}$$

Si l'oxydant seul est électro-actif, l'oxygène n'a pas d'influence sur le potentiel, mais cependant tend à élever la concentration limite. Au-dessus de celle-ci, le potentiel est fonction de la concentration de l'oxydant

$$E = A + \frac{0{,}058}{n} \log |ox|^m$$

Au-dessous de celle-ci, le système ne comporte que des ions non électroactifs, il n'y a pas de potentiel défini.

5° Importance de la notion de concentration limite

Nous avons vu qu'au-dessous d'une certaine concentration les ions cessent d'être électroactifs et qu'interviennent alors l'eau ou l'oxygène dissous. Cette concentration semble dans la plupart des cas varier de 10^{-4} à 10^{-5}. Elle dépend de la présence de l'oxygène et COURSIER (9) parle de « concentration limite en présence d'air ».

Or dans le cas des boissons de nombreux constituants se trouvent à des concentrations de cet ordre, le fer de 0 à 12 mg, le cuivre de 0 à 5 mg. Il devient donc impossible de raisonner en utilisant les potentiels normaux de ces différents systèmes et c'est probablement pour cela qu'on se heurte à des contradictions apparentes en particulier pour les potentiels du fer.

COURSIER a étudié le cas des oxydo-réductions avec échange d'électrons mais si cette notion de « concentration limite » est aussi valable dans le cas d'échange de protons, cette notion de concentration limite devient la notion de base de tous les phénomènes d'oxydo-réduction. En effet presque tous les systèmes de ce type : acide ascorbique, acide déhydroascorbique, réductones, colorants se trouvent dans les boissons et dans les systèmes biologiques en général à des doses voisines de 10^{-4} mole. Les potentiels mesurés risquent donc d'être souvent des potentiels mixtes. Les « concentrations limites » des oxydants et des réducteurs, à l'air et à l'abri de l'air deviennent des facteurs intéressants qui méritent d'être étudiés de plus près.

6° Variation du potentiel en fonction du pH.

CLARK avait proposé comme mesure du niveau redox la notation en rH_2 : logarithme décimal de l'inverse de la pression fictive d'hydrogène gazeux en équilibre de dissolution avec le système oxydo-réducteur:

$$rH_2 = \log \frac{1}{PH_2}$$

le rH_2 étant lié au potentiel par rapport à l'électrode à hydrogène E_H en millivolts et au pH par la relation :

$$rH_2 = \frac{E_H}{29} + 2\,pH \text{ à } 20^oC.$$

Cette notation est de moins en moins employée, et CLARK lui-même a conseillé de l'abandonner. Cependant elle est très souvent utilisée encore en biologie. Dans le cas qui nous intéresse elle est utilisée dans tous les travaux allemands sur le potentiel redox des boissons.

Nous verrons d'ailleurs que dans la limite étroite de pH des cidres (3,5 à 4,0) elle permet de mettre en évidence des analogies de niveau redox entre des échantillons de pH différents. Mais cette notation doit être utilisée avec prudence, et n'est sûrement pas valable pour toute la gamme de potentiel redox rencontré dans les boissons, ainsi la courbe potentiel/pH du système acide ascorbique/acide déhydroascorbique présente un point d'inflexion très net dû à l'ionisation de sa fonction acide à pH = 4 d'après BALL selon BARAUD (12) et il est fort possible qu'il se présente un phénomène analogue pour d'autres corps diénoliques. Le groupement acide serait en effet pour l'acide ascorbique selon VOGEL, le groupement énolique situé près du groupe lactone carboxyle. Cependant BARAUD (12) n'a pas trouvé d'inflexion pour un autre diénol, l'acide dihydroxymaléique entre 3 et 5,5, ce qui tend à prouver que tous les dienols ne sont pas forcément acides.

La notation rH_2 n'est pas non plus valable pour les oxydations sans échange de protons, en particulier les potentiels influencés par le fer, s'ils existent, sont théoriquement indépendants du pH. En fait dans le cas du système Fer ferreux/Fer ferrique, il est modifié par la précipitation d'hydroxyde ferrique restant peptisé en solution colloïdale au-delà de pH = 2. Si le passage se fait avec échange de protons ce qui est le cas des oxydo-réductions catalysées par les dehydrogénases en présence d'accepteurs d'hydrogène deux cas peuvent se présenter :

a) Aucune forme n'est ionisable en acides ou bases (système alcool $\rightleftarrows$ aldéhyde par exemple), ou on se trouve à un potentiel nettement inférieur au pK d'ionisation acide de telle sorte que cette ionisation est négligeable (système polyphénols $\rightleftarrows$ quinones à des pH inférieurs à 8).

Le potentiel varie de 58 mV par unité pH à 20°C et suit donc la formule :

$$rH_2 = \frac{E_H}{29} + 2\,pH$$

b) Une forme est ionisable en acide ou en base, la courbe potentiel-pH présente un point d'inflexion au pH voisin du pK de la forme ionisable. aux environs de ce pH, puis au-dessus, la relation

$$rH_2 = \frac{E_H}{29} + 2\,pH$$

n'est plus vérifiée. C'est le cas de l'acide ascorbique aux environs de pH = 4.

Pour les potentiels mixtes ou limites des systèmes ne faisant pas intervenir de protons, indépendants du pH, COURSIER (9) a étudié ces phénomènes à l'aide des courbes de polarisation et tout spécialement les potentiels mixtes et limites de systèmes où seul le réducteur est actif en présence d'oxygène dissous.

Les potentiels mixtes ou limites, s'ils existent, de système s'équilibrant avec échange de protons, dépendent probablement du pH et l'on doit retrouver la règle normale suivant que le corps électroactif est ou n'est pas ionisé.

Comme on retrouve dans les boissons un certain nombre de niveaux redox bien déterminés, la courbe potentiel-pH pourrait être intéressante en nous renseignant partiellement sur le type du potentiel mesuré et en donnant même quelques renseignements sur les corps électroactifs tels que leurs pK approximatifs.

7° Cas des cidres et jus de pommes

Il faut considérer tout d'abord que les systèmes redox du cidre et des jus sont encore très mal connus.

On connaît l'existence de réducteurs diénoliques. Parmi eux l'acide ascorbique existe dans les jus de pommes et de poires à des teneurs variant de 50 à 190 mg par litre de vitamine C (somme des acides ascorbique et déhydroascorbique) dans les jus de pommes à cidre et de 8 à 22 mg dans les jus de poires à poiré d'après les travaux de TAVERNIER et JACQUIN (13). Ce système disparaît par fermentation puisqu'ils n'en retrouvent que la moitié ou le tiers et disparaît de même par pasteurisation. Encore faut-il spécifier que dans ces deux cas, il peut y avoir interférence de corps réductoniques provenant de la fermentation et du chauffage, la méthode de dosage utilisée dérivée de celle d'EMMERIE et Van ECKELEN ne permettant pas la séparation de la forme réductrice rapide de ces corps.

Des réductones, corps diénoliques prennent naissance lors de la fermentation. Ces corps existent sous deux formes en équilibre, la forme cétonique et la forme diénolique. La forme diénolique semble présenter un pouvoir réducteur rapide analogue à celui de l'acide ascorbique. Le pourcentage par rapport au total en est variable (de 0 à 25 p. 100 sensiblement) et dépend probablement du milieu. La vitesse d'énolisation en est aussi variable, c'est probablement pourquoi on parle d'un pouvoir réducteur rapide et d'un pouvoir réducteur lent des réductones. Leur pouvoir réducteur rapide correspond à quelques milligrammes d'acide ascorbique, leur pouvoir réducteur lent est bien plus difficile à évaluer.

Il ne faut pas non plus négliger la présence de mélanoïdines présentant des groupements aminés au lieu des groupements cétoniques des réductones et qui auraient aussi un pouvoir réducteur. Il existerait d'ailleurs des corps mixtes présentant un groupement cétonique et un groupement aminé, possédant eux aussi un double pouvoir réducteur immédiat puis plus lent lié à la vitesse d'énolisation.

On désigne sous le nom de tannoïdes, les corps oxydables par le permanganate selon la technique de LÖWENTHAL, soit en fait les corps oxydables par le permanganate en milieu sulfurique avant le carmin d'indigo. Nos connaissances sur ces corps sont encore très vagues. Ce sont des composés flavoniques, leucoanthocyaniques, catéchiques ; des tanins formes condensées des catéchines, des polyphénols dont l'acide chlorogénique. Ils présentent une fonction orthodiphénolique qui peut s'oxyder par catalyse métallique ou par oxydation enzymatique en o-quinone qui en se polymérisant donneraient des phlobaphènes insolubles. Mais il ne faut pas oublier qu'on passe de l'un à l'autre de ces pigments par des oxydations ou des réductions sur le cycle.

Flavonols $\rightleftarrows$ anthocyanidols $\rightleftarrows$ leuco-anthocyanidols $\rightleftarrows$ catéchines, ces réactions sont peut-être possibles dans les jus ou les cidres grâce à des enzymes ou des métaux catalyseurs.

Ces tannoïdes existent à des concentrations très variables, de 1 à 8 grammes par litre évalués en tanin de chêne par la méthode de LÖWENTHAL.

MASQUELIER (14) évalue les leucoanthocyanes de cidres normands à 300 à 500 mg et les aglucones flavoniques à 50 à 250 mg par litre.

L'acide chlorogénique existerait à des teneurs de l'ordre de 0 à 500 mg par litre.

Des réducteurs sulfhydrylés peuvent éventuellement être apportés par la levure, cystéine et glutathion par exemple, mais il est probable que des systèmes inconnus interviennent aussi dans ces réactions.

Que peut-on dire de ces systèmes ?

Ils ne sont pas tous réversibles, l'existence de troubles irréversibles de précipitation de phlobaphènes en est une preuve.

Certaines formes sont peu électroactives et réagissent lentement, il est probable que certaines d'entre elles sont pratiquement irréversibles et qu'il existe donc de nombreux potentiels mixtes. Le grand nombre des systèmes possibles, oblige à considérer la possibilité d'action simultanée de deux systèmes dont les courbes de polarisation ne sont pas suffisamment séparées.

La présence de fer de 0 à 12 mg et de cuivre de 0 à 5 mg dans le jus et les cidres peut même rendre électroactifs et réversibles des systèmes qui ne le sont pas naturellement. On peut raisonner d'ailleurs de même pour les enzymes oxydantes, peroxydases, polyphénoloxydases qui existent naturellement dans le jus et qui peuvent être apportées par des microorganismes comme le botrytis dans les cidres fermentés.

On peut constater d'autre part que de nombreux constituants des cidres et des poirés se trouvent dans ceux-ci à des concentrations voisines de 10^{-4} à 10^{-5} molécules. Comme il semble que la plupart des concentrations limites sont de cet ordre, les potentiels limites s'y rencontrent probablement fort souvent, et des potentiels mixtes s'établissent avec l'eau ou avec l'oxygène dissous. On peut même se demander si des corps fortement électroactifs, formant un système nettement réversible ne passent pas inaperçus, leurs deux formes se trouvant à des concentrations inférieures à la concentration limite.

Ce pourrait être en particulier le cas de faibles teneurs en fer en présence d'oxygène. Si la concentration limite à l'air est voisine de 10^{-4} molécules, il faut 5,6 mg pour que les ions Fe^{+++} ou Fe^{++} soient électroactifs. Or les ions ferriques étant complexés par les acides-alcools, il n'y a pratiquement jamais d'ions ferriques ou ferreux dans les cidres ou les jus aérés. On peut raisonner de même pour les traces de cuivre, et il semble en définitive que ces deux métaux agissent plus comme catalyseurs que comme de véritables systèmes redox.

Lors de la fermentation ou lors de certains troubles d'origines microbiologiques, les levures ou bactéries peuvent encore intervenir par leurs enzymes et leurs coenzymes, ce qui complique encore le problème.

CONCLUSION DU CHAPITRE

Notre conclusion sera plus optimiste que celle de Gray et Stone. Si le potentiel mesuré ne donne pas une valeur automatique de l'état d'oxydation ou de réduction de la boisson, cette mesure est d'un grand intérêt pour l'explication de nombreux phénomènes encore inconnus et la mesure du potentiel malgré la diversité des systèmes mis en cause offre un très gros intérêt surtout si on couple ces mesures avec une détermination de courbes de polarisation.

III. — OBSERVATIONS SUR LES TECHNIQUES DE MESURE DES POTENTIELS REDOX

Deibner (2) ayant publié des travaux récents, tant sur l'historique, l'appareillage et les techniques utilisées par les différents chercheurs français et étrangers, nous ne reviendrons pas ici sur ces points et nous nous contenterons de décrire rapidement dans une première partie l'appareillage et la technique que nous avons utilisés et dans une seconde partie nous exposerons quelques remarques sur des phénomènes qui nous sont apparus au cours de nos mesures.

1° Appareillage

a) potentiomètre

Nous avons utilisé le potentiomètre de la maison Metrohm qui permet d'apprécier le potentiel à 2 mV près et le pH à 0,025 unités près. Cette précision est largement suffisante comme nous le verrons tout à l'heure.

Nous avons vérifié certaines de nos mesures avec un potentiomètre Meci et la corrélation était très satisfaisante.

Les deux potentiomètres et leurs électrodes étaient étalonnés par rapport à une solution de quinhydrone dans un tampon de pH connu. On sait en effet que le potentiel d'une solution de quinhydrone en l'absence d'oxydants ou de réducteurs est bien déterminé si l'on connaît le pH et la température du milieu.

b) électrodes indicatrices

Nous avons utilisé 3 types d'électrodes de platine : en fil de 5/10 de mm de diamètre, 1 cm de long terminé par une boule ; en plaque mince de 5 mm sur 4 mm soit 20 mm^2 et en plaque de 1 cm sur 1 cm, soit 1 cm^2.

En effet, les potentiels mixtes varient avec la nature et la surface active des électrodes, car les courbes de polarisation en dépendent et il est intéressant de vérifier si cette variation est sensible ou inférieure à la précision des mesures.

Pour toutes les électrodes, il importe que la soudure verre-métal soit absolument étanche. Si le liquide pénètre à l'intérieur de l'électrode, la mesure est faussée, car il se superpose au potentiel du métal noble le potentiel de la soudure du métal noble au fil conducteur. Deibner (2) recommande de placer cette soudure au sommet de l'électrode soit bien au-dessus du niveau du liquide.

Le nettoyage des électrodes est très important. Nous l'avons réalisé

jusqu'ici par le mélange sulfo-chromique. Malheureusement les électrodes influencées par ce traitement malgré un rinçage énergique, prennent au départ un potentiel élevé, ce qui retarde d'autant l'établissement de l'équilibre stable.

c) Électrode de référence

Nous avons utilisé l'électrode classique au calomel et au chlorure de potassium saturé. L'électrode plonge directement dans le vase à réaction. La jonction est effectuée par une mèche d'amiante soudée à l'extrémité capillaire de l'électrode. Deibner estime que ce dispositif est préférable à celui utilisant un pont de jonction extérieur.

d) Vase de mesure

Nous avons utilisé le vase Metrohm d'une seule pièce, comprenant 5 rodages à la partie supérieure permettant d'y placer les électrodes, le thermomètre, et le tube d'évacuation du gaz inerte et un robinet à deux voies à la partie inférieure qui permet la vidange et le barbotage du gaz inerte.

Lors des essais d'oxydation, nous y faisons barboter l'air en aspirant à l'aide d'une trompe à vide.

e) Dispositif de désaération

Nous avons utilisé le gaz carbonique, mais il semble préférable d'utiliser l'azote R de la société L'Air Liquide.

Le CO_2 était produit par l'attaque chlorhydrique de marbre blanc dans une boule de Kipp. Le gaz obtenu est pratiquement exempt d'oxygène les dernières traces étant fixées facilement par du pyrogallate alcalin. Malheureusement le marbre n'étant jamais exempt de sulfure, il faut éliminer les traces d'hydrogène sulfuré qui risque d'agir comme réducteur, comme inhibiteur diastasique pour les jus et surtout comme poison des électrodes. Il convient donc de l'éliminer par des flacons laveurs au sous-acétate de plomb et à l'acétate de calcium.

L'azote R était purifié par passage sur deux flacons de pyrogallate alcalin.

Dans les deux cas nous avons contrôlé l'efficacité de la désaération par un barboteur à hydroxyde manganeux (solution alcaline de sulfate de manganèse) qui brunit au contact de la moindre trace d'oxygène. On n'ajoute évidemment la solution de soude que lorsque le flacon est absolument purgé d'air.

Deibner emploie le dispositif de Koulnevitch qui utilise le verdissement du carmin d'indigo en solution basique par des traces d'oxy-

gène. La solution carbonatée de carmin d'indigo est maintenue au jaune par quelques gouttes d'hydrosulfite en solution dans du carbonate de soude. Le dispositif est décrit, en détail dans la dernière étude de DEIBNER et semble intéressant.

2° **Remarques sur les mesures de potentiel redox.**

a) DIFFÉRENCE ENTRE LES ÉLECTRODES

Nous avons noté des différences de l'ordre de 10 mV entre deux électrodes semblables.

Cette différence semble s'accentuer si l'on opère avec des électrodes de surface différente. Elle devient très importante et peut atteindre 30 mV entre les électrodes à plaque de 1 cm^2 et les électrodes en fil. Cette différence est surtout sensible dans les mesures à l'air. Nous avons aussi retrouvé des différences du même ordre dans les potentiels bas qui s'établissent difficilement.

Il est cependant difficile de tirer une règle générale. Pour certains potentiels la différence est négligeable et ne dépasse pas 5 mV quelle que soit l'électrode utilisée, c'est en général le cas pour les potentiels voisins de 310 mV par rapport à l'électrode d'hydrogène.

Cette différence variable pourrait s'expliquer par l'état de réversibilité du système redox. Pour les systèmes réversibles en effet, la surface de l'électrode est négligeable alors que pour les potentiels mixtes, limites ou pour les systèmes peu réversibles, la surface active de l'électrode joue un rôle important qui apparaît selon COURSIER (9) dans les courbes de polarisation. La surface active difficilement mesurable est fonction de la surface vraie de l'électrode, mais aussi de l'état de cette surface.

Nous avons effectué quelques mesures comparatives entre des électrodes de platine et d'or. Il semble qu'il y ait des différences importantes pour les potentiels en présence d'oxygène. Certains auteurs expliquent cette différence par une action catalytique du platine et recommandent l'utilisation d'électrodes de platine doré pour les mesures de potentiel, l'activité catalytique de l'or étant plus faible. Sans négliger cette théorie, nous pensons qu'il s'agit plutôt d'une différence dans les courbes de polarisation de ces deux types d'électrodes, liée à leur différence de surtension qui peut devenir notable pour les potentiels mixtes.

b) INFLUENCE DE L'AGITATION

L'agitation intervient sur le potentiel de façon non négligeable, la différence peut atteindre 10 à 15 mV, mais est en général de 4 à 5 mV ce qui est de l'ordre des erreurs admises.

La différence semble beaucoup plus faible pour les cas signalés précé-

demment où l'on trouve le même potentiel quelle que soit la surface de l'électrode.

Une différence notable lors de l'agitation serait la preuve de l'existence d'un potentiel mixte, une seule des formes redox étant électroactive (COURSIER). Mais malheureusement il semble difficile là aussi d'établir une règle stricte.

c) MESURES DANS LES MILIEUX TROUBLES

Ce cas se présente pour les jus où il y a toujours des pulpes en suspension et qui ont tendance à déféquer, les pectines en pseudo-solution s'insolubilisant sous l'action de la pectine-methylestérase et des sels de chaux. Il se présente aussi dans plusieurs types de cidres défectueux. C'est en particulier le cas des cidres atteints de casse tanno-ferrique où à partir d'une certaine teneur en fer, celui-ci se trouve sous forme d'hydroxyde ferrique colloïdal peptisé par les acides du milieu. C'est encore le cas des cidres framboisés où l'on trouve en pseudo-solution des composés éthanal-tannoïdes qui se déposent très lentement.

Dans tous ces cas on trouve souvent des chiffres aberrants comme si l'électrode étant recouverte d'une fine pellicule de colloïde, sa surface active est considérablement modifiée.

La présence dans le jus ou le cidre de moisissures et de mycodermes, risque aussi de fausser la mesure.

Les résultats trouvés dans ces différents cas ne doivent être utilisés qu'avec circonspection. Il est bon d'opérer avec plusieurs électrodes et lorsque l'équilibre semble établi, d'agiter fortement l'échantillon, une variation de potentiel supérieure à 10 ou 15 mV est un indice d'empoisonnement. DEIBNER a remarqué un phénomène analogue avec les jus de raisin, il recommande de tourner les électrodes autour de leur rodage et de chasser les pulpes fixées aux électrodes par de petits chocs sur les bords du vase à réaction.

Cette influence des matières en suspension rend très délicate la détection des maladies par la mesure du potentiel.

d) INFLUENCE DU GAZ INERTE

Nous avons noté des chiffres aberrants lorsque les bulles du gaz de barbotage recouvrent l'électrode. Il y a probablement là encore une variation de la surface active. Lorsque l'équilibre semble établi il est bon d'agiter fortement et de tourner l'électrode autour de son rodage.

DEIBNER (2) note dans les jus des différences selon que l'on utilise du gaz carbonique ou de l'azote. Nous n'avons pas pour notre part noté de telles différences, mais il semble bon dans le cas des jus tout spécialement de vérifier l'égalité du potentiel dans les deux gaz inertes.

e) Influence du temps

Les électrodes sont nettoyées avant usage par un traitement sulfo-chromique. Mais malgré un rinçage énergique, elles conservent la mémoire du traitement et indiquent au début de la mesure un potentiel très élevé tendant vers celui du mélange sulfo-chromique. Cette influence du prétraitement de l'électrode étant fort variable, il est difficile de prévoir la durée de stabilisation du potentiel. Aussi les méthodes basées sur la moyenne de quelques mesures ne peuvent donner que des résultats erronés et nous pensons qu'il est nécessaire d'attendre l'établissement d'une valeur stable. Pratiquement nous attendons que la différence entre deux mesures effectuées à 15 m d'intervalle sont inférieure à 2 mV, soit la précision du potentiomètre.

Une solution intéressante est d'utiliser deux électrodes semblables traitées l'une par un oxydant, l'autre par un réducteur de telle sorte que le potentiel probable soit encadré par le potentiel de ces électrodes au début de la mesure. L'équilibre est alors établi lorsque les deux électrodes donnent la même valeur. Le nettoyage électrolytique des électrodes préconisé par Palacios et Vecino (15) pourrait être intéressant pour préparer l'électrode à mémoire réductrice.

f) Influence de l'air dissous

L'influence de l'air dissous est connue depuis longtemps. L'oxygène ne semble d'ailleurs pas intervenir comme électrode à oxygène, puisqu'il n'y a pas de corrélation très nette entre la pression partielle de l'oxygène et le potentiel. Il intervient sans doute dans l'établissement de potentiels mixtes analogues à ceux signalés par Coursier.

Nekrassov d'après Deibner (2) recommande de dégazer l'électrode si l'on veut mesurer le potentiel des systèmes lents. Cette précaution paraît intéressante pour certains systèmes redox, les réductones en particulier qui existent en faibles quantités. Mais la réalisation pratique semble très délicate. Nous préférons pour notre part, l'emploi de deux électrodes semblables l'une traitée en milieu réducteur, l'autre en milieu oxydant.

Nous avons essayé d'étudier plus particulièrement le phénomène d'oxydation par l'air, qui nous intéresse en premier lieu. Les résultats de nos travaux sont exposés dans la troisième partie de cette étude.

g) Empoisonnement des électrodes

Nous avons noté lors de nos travaux un pourcentage important de résultats inexplicables. C'est pourquoi il est bon d'utiliser le maximum possible d'électrodes.

Ces empoisonnements ne sont pas toujours explicables dans l'état

actuel de nos connaissances. Ils sont probablement liés à la surface des électrodes, et là encore les courbes de polarisation pourraient être utilisées de façon intéressante.

Il faut se méfier des empoisonnements par les composés sulfurés, par les colloïdes qui recouvrent l'électrode d'une pellicule, par les pulpes en suspension dans le liquide ou les mycéliums provenant de micro-organismes. Il semble même qu'il puisse exister des empoisonnements par le gaz de désaération si celui-ci s'occlue dans l'électrode.

h) Précision des mesures

M[lle] Beziers (7) considère qu'on détermine les potentiels à 5 mV pour les potentiels de systèmes réversibles et à 20 mV ou plus pour les potentiels mixtes ou les potentiels de systèmes peu réversibles, dans les milieux minéraux. Il nous semble qu'une telle précision est le maximum que nous puissions espérer étant donnée la complexité des milieux étudiés.

CONCLUSION

Lors des mesures de potentiels redox dans les boissons, il faut se garder de conclusions trop hâtives. Les cas d'empoisonnement des électrodes sont extrêmement nombreux. Les mesures sont longues et délicates, accessibles seulement à des laboratoires de recherches. Il ne semble pas que la notion de potentiel redox soit susceptible, dans l'état actuel de nos connaissances, d'applications pratiques dans les industries de fermentation.

IV. — POTENTIELS D'OXYDO-RÉDUCTION DES CIDRES

1° Influence de la fermentation.

Dans une étude précédente réalisée avec P. Jacquin (1), nous avons mesuré les potentiels dans 33 cidres de la Station, fermentés en bonbonnes et maintenus en anaérobiose par un barbotteur contenant une solution sulfureuse, la fermentation maintenant une légère surpression en CO_2 et empêchant les rentrées d'air.

Les rH_2 obtenus se répartissent comme suit :

Tableau I

rH_2 de 33 cidres en bonbonnes au stade de fermentation languissante

rH_2	Nombre de cidres	rH_2	Nombre de cidres
12	1	13,60 à 14,0	9
12 à 12,40	0	14,0 à 14,40	4
12.40 à 12,80	4	14,40 à 14,80	7
12,80 à 13,20	1	14,80 à 15,20	1
13,20 à 13,60	4	15,20 à 15,60	2

Nous avons groupé les résultats par groupe de 0,40 unité rH pour tenir compte des erreurs de mesure qui peuvent atteindre, comme nous l'avons vu ± 5 mV pour les potentiels de systèmes réversibles auxquels s'ajoute dans la notation rH_2 l'erreur introduite dans la mesure du pH, obtenu à 0,05 unité près.

Ces résultats sont confirmés par d'autres mesures établies dans quelques-uns de ces cidres, embouteillés sans laisser d'air dans le col et conservés près de deux ans au repos.

TABLEAU II

	en bouteille			résultats précédents		
	mV	pH	rH_2	mV	pH	rH_2
Reine des hâtives	210	3,55	14,20	162	3,50	12,50
Egyptia	140	3,65	12	178	3,80	13,70
Petit gilet rouge	150	3,20	11,50	235	3,0	14,0
Coquerelle	240	3,0	14,20	247	3,15	14,70
Coquerelle (bouteille coulante)	330	3,0	16,95			
Egyptia (bouteille coulante	260	3,65	15,50			

Ils sont encore confirmés par certains échantillons de cidres industriels ou paysans reçus à la Station. (Tableau III)

Ces cidres embouteillés sans précautions spéciales, avaient été pour la plupart conservés au froid. A leur arrivée, ils présentaient des potentiels de cidres oxydés, mais la fermentation ayant repris, on retrouva des potentiels comparables aux précédents.

TABLEAU III

	à l'arrivée			après fermentation			
	mV	pH	rH_2	mV	pH	rH_2	sucres fermentés en g.
A_1	295	3,80	17,60	205	3,80	14,40	40 g.
A_2	310	3,75	18,10	180	3,75	13,60	50 g.
A_1				170	3,8	13,40	30 g.

Comme nous l'avons dit dans notre introduction, la notation en rH_2 est discutée ; aussi nous avons groupé ces résultats en tenant simplement compte du potentiel. Les résultats des 33 cidres précédemment étudiés et des 7 cidres étudiés ci-dessus en éliminant les bouteilles coulantes, sont classés dans le tableau IV.

On ne peut donc pas décider à l'examen de ce résultat s'il s'agit d'un système avec échange de protons, potentiel variant avec le pH,

ou d'un système à échange d'électrons seulement, pratiquement peu influencé par le pH.

TABLEAU IV

Potentiel de 40 cidres au stade de fermentation languissante

*m*V	Nombre de cidres	*m*V	Nombre de cidres
100 à 110	1	180 à 190	3
110 à 120	0	190 à 200	4
120 à 130	0	200 à 210	3
130 à 140	0	210 à 220	3
140 à 150	4	220 à 230	2
150 à 160	1	230 à 240	3
160 à 170	5	240 à 250	3
170 à 180	8		

C'est pourquoi nous avons essayé de suivre la variation du potentiel en fonction du pH dans quelques cidres provenant de bouteilles bouchées depuis plus d'un an, donc à leur maximum de réduction.

TABLEAU V

	Moulin à vent						Petit doux		
pH	4,74	4,50	4,04	3,85	3,55	3,20	5,25	3,85	2,85
Potentiel	205	220	240	260	278	290	160	250	300
rH_2	16,50	16,50	16,35	16,50	16,60	16,30	15,90	15,90	15,95

Pour ces 2 échantillons, les potentiels semblent donc varier régulièrement avec le pH mais nous avons trouvé pour d'autres cidres des résultats bien moins convaincants : en particulier pour le cidre de la variété Pen Chopine, nous obtenons pour des pH variant de 2,85 à 4,95 des rH_2 variant de 15,0 à 18,60 et des potentiels variant de + 150 mV à 390 mV.

Ces mesures ont été opérées sous un courant d'azote R, purifiée par barbottage dans du pyrogallate et de l'hydroxyde manganeux.

2° Interprétation

L'hypothèse la plus vraisemblable est celle de l'existence dans les cidres fermentés se conservant doux, au stade de fermentation très lente, d'un système diénolique de $rH_2 = 14 \pm 1$, qui pourrait être le système G' de WURMSER, le système acide ascorbique-acide déhydroascorbique, mais plus probablement un système dû à des réductones formées lors de la fermentation. Cependant les résultats obtenus ne nous permettent pas encore d'éliminer la possibilité d'un système d'échange électronique qui pourrait être celui du cytochrome C de la levure, ou encore celui des complexes ferreux/ferriques de l'acide malique. H. de ALMEIDA (16)

dans une étude sur les vins de Porto a étudié un tel système. A pH = 3,60 une solution d'acide malique à 3 g/l contenant 10 mg de Fer au litre passe de 379 mV pour un rapport fer ferrique/fer ferreux égal à 1/9 à 452 mV pour un rapport 9. Le système ne paraît donc pas être celui du cidre réduit. Le système du cytochrome C correspondrait plutôt aux résultats précédents : en effet, on admet pour ce système 255 mV pour l'équilibre des formes oxydées et réduites entre des pH variant de 5 à 8, avec une différence de ± 60 mV environ pour des rapports allant de 9/1 à 1/9, ce potentiel pouvant descendre à 76 mV pour le cytochrome entièrement réduit. Malheureusement, on ne peut affirmer qu'il en est de même pour des pH inférieurs à 4 comme c'est le cas pour les cidres.

On voit donc que, comme en œnologie d'ailleurs, la nature exacte des systèmes redox est loin d'être élucidée. On peut simplement constater que là aussi, la fermentation tend à abaisser les potentiels redox, cet abaissement étant lié à la vitesse de la fermentation comme nous l'avons montré dans une étude précédente (1).

3° Influence de l'aération sur les potentiels des cidres.

La plupart des troubles classiques en cidrerie se produisant lors d'une introduction accidentelle d'air dans le cidre lors des manipulations, nous avons étudié la variation du potentiel lors de l'introduction d'air. Pour cela, nous avons fait barboter à un rythme bien déterminé et invariable, de l'air dans 50 cm³ des cidres étudiés. Dans tous les cas le montage était le même. Le cidre était agité en plus par une agitation magnétique, la vitesse d'acration étant fixée une fois pour toutes.

Tableau VI

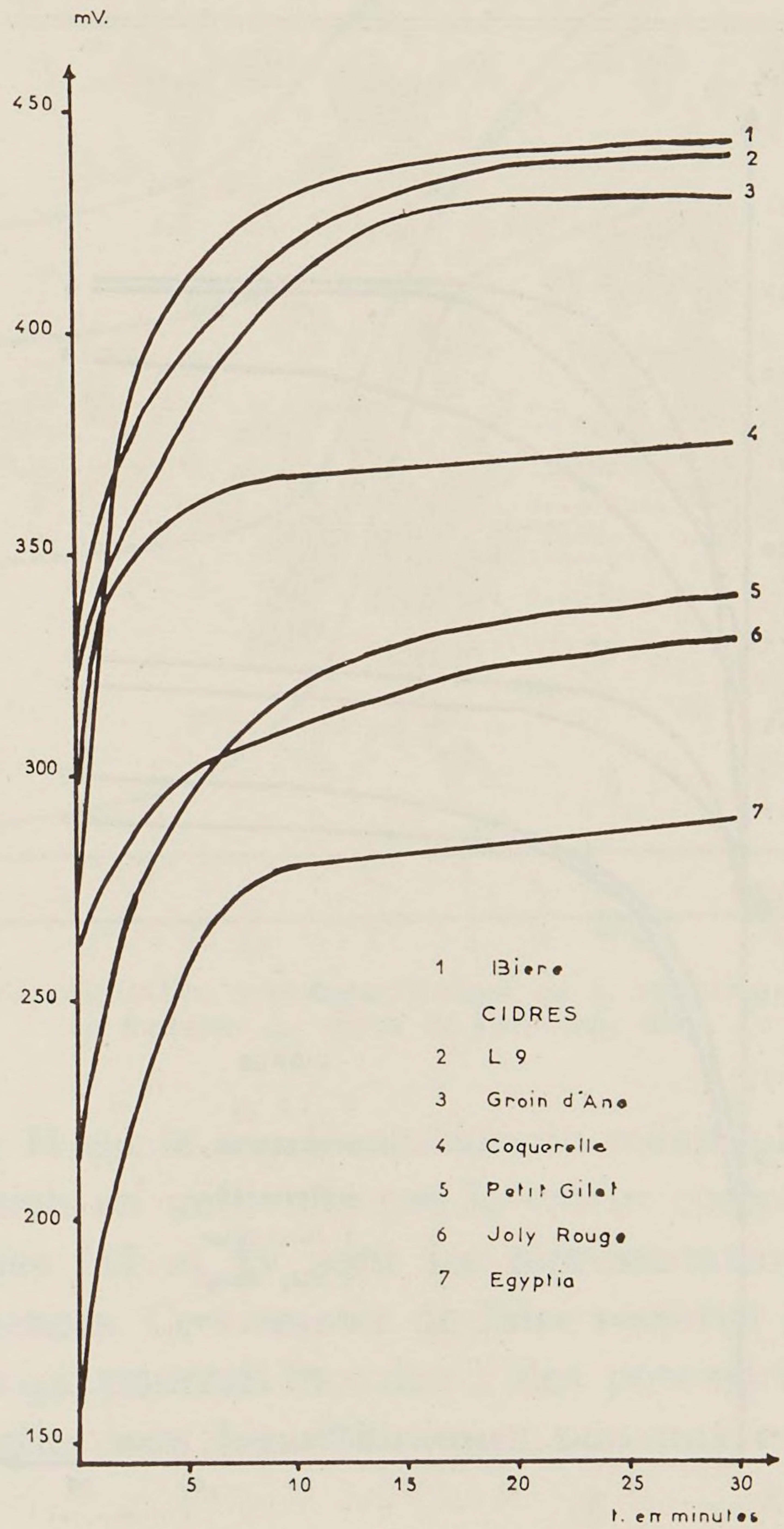
	Temps en minutes — Potentiels					rH_2 à 30 min,	pH
	0	5	10	20	30		
1 Egyptia	150	255	277	286	290	17,10	3,65
2 Petit Gilet Rouge	210	296	312	336	340	17,60	3,0
3 Joly Rouge	250	300	312	324	330	18,60	3,70
4 Reine des Hâtives	258	320	336		345	18,85	3,55
5 Coquerelle I	286	360	368	372	376	18,90	3,05
6 Moulin à Vent	210	290			310	17,90	3,70
7 Noël des Champs	290		330		340	18,60	3,50
8 Groin d'Ane	320	380	410	430	430	22,20	3,80
9 Cidre R	260	305	310	320	325	18,70	3,75
10 Cidre O	210	345		358	360	19,70	3,70

Nous avons noté la variation du potentiel en fonction du temps de barbotage. Les expériences ayant été effectuées dans les mêmes conditions, les résultats sont comparables.

Au cours des 5 premières minutes, la variation de potentiel est très rapide ainsi qu'il apparaît au tableau VII.

TABLEAU VII

	Temps en minutes				rH_2 à o min.	rH_2 à 5 min.
	o	1	2	5		
	Potentiels					
1 Egyptia	150	185	218	255	12,40	14,65
2 Petit Gilet Rouge	210	230	256	296	13,10	16,10
3 Joly Rouge	250	280		300	15,90	17,60
4 Reine des Hàtives	258	288	300	320	15,20	18,0
5 Coquerelle I	286	328	346	360	15,80	18,35
9 Cidre R	260	280	290	305	16,40	17,90
10 Cidre O	210	308	330	345	14,90	18,90



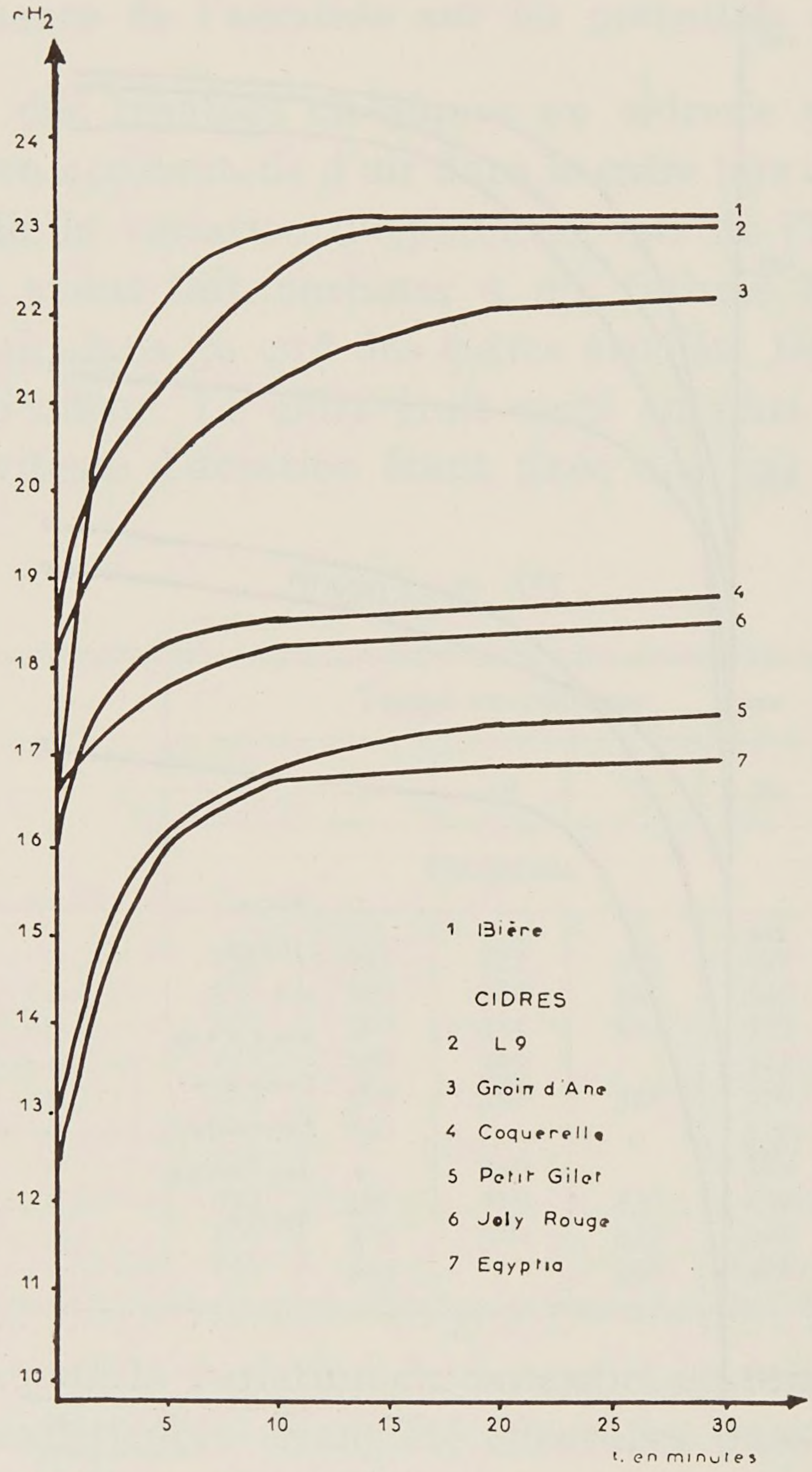
GRAPHIQUE I. — Variation du potentiel en fonction du temps de barbotage d'air dans des cidres.

Cette variation rapide est confirmée par une autre série d'essais ; dans 30 cm³ de cidre, débarrassé d'air par barbotage de CO_2, nous ajoutons de l'eau saturée d'air, par agitation pendant 1 heure. Le pouvoir tampon élevé des cidres nous permet d'ajouter 10 cm³ d'eau saturée sans toucher au pH. Le cidre est donc ainsi à 1/4 de saturation, soit sensiblement une teneur de 1,5 cm³ d'oxygène dissous. Une partie de l'air dissous tend évidemment à se mettre en équilibre dans le gaz carbonique sur-

TABLEAU VIII

Variation du potentiel en fonction de la quantité d'O_2 apporté par de l'eau saturée

	0	1	2	5	10 cm₃
1 Egyptia	150	258	270	290	314
3 Joly Rouge	250	254	256	265	278
4 Reine des Hâtives	200	236		255	265
5 bis Coquerelle II	240	254	278	305	324
5 ter Coquerelle III (bouteille suintante)	320	326	334	350	362

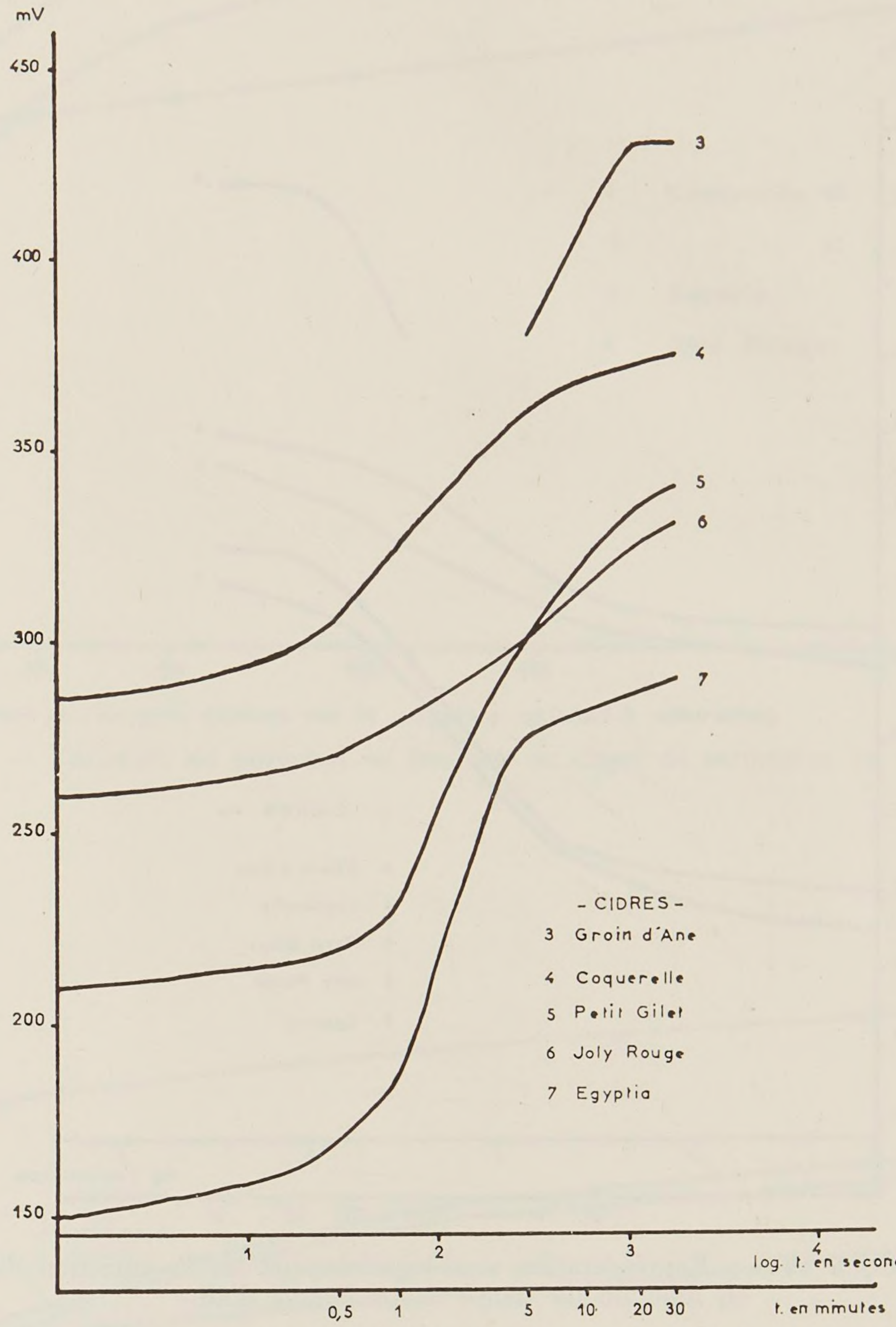


GRAPHIQUE II. — Variation du rH_2 en fonction du temps de barbotage d'air dans des cidres.

plombant le cidre. On note cependant une augmentation très nette du potentiel.

Nous avons représenté graphiquement quelques-uns de ces résultats.

Le graphique I représente la variation du potentiel par rapport à l'électrode à hydrogène, en fonction du temps de barbotage de l'air, en minutes.



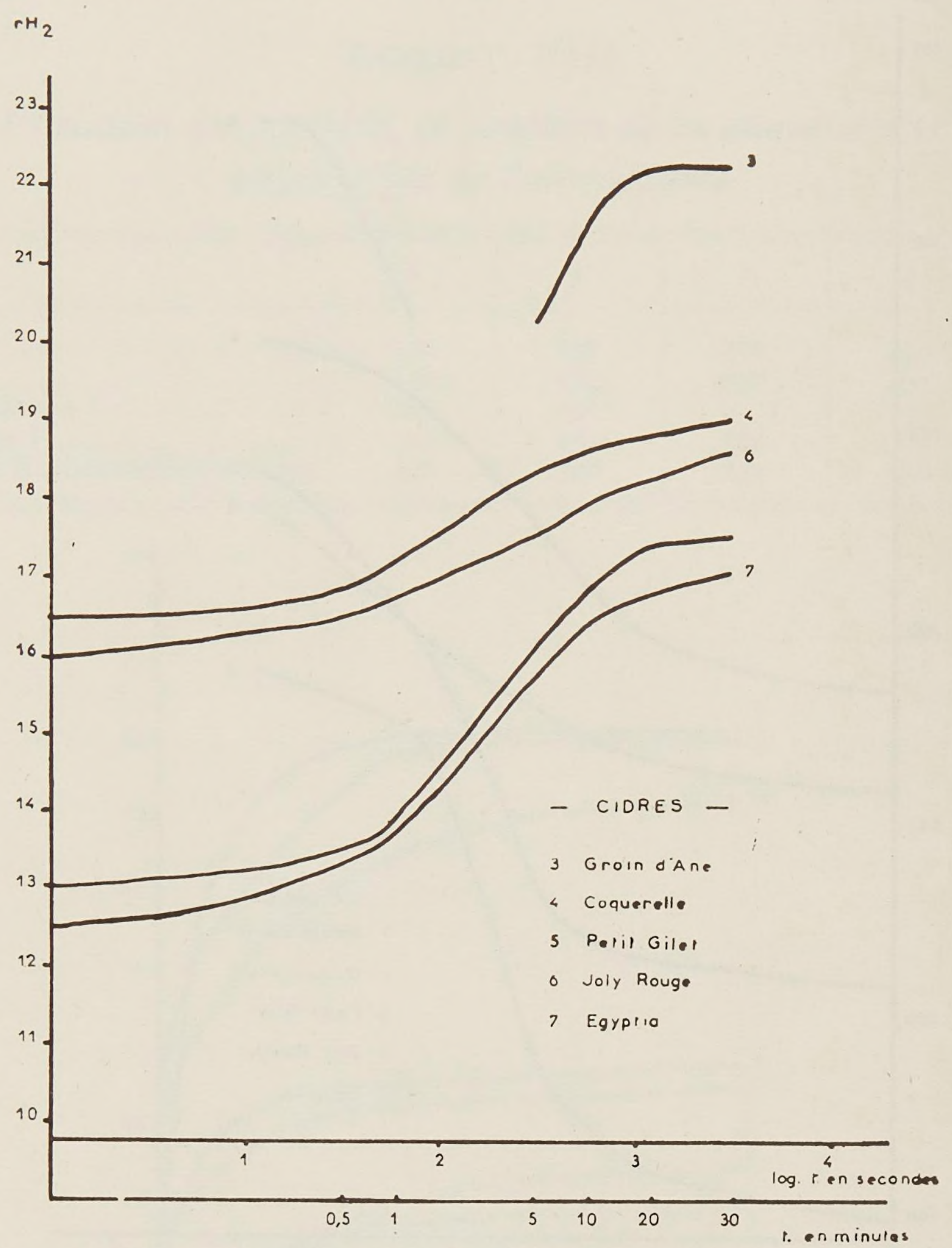
GRAPHIQUE III. — Représentation semi-logarithmique de la variation du potentiel en fonction du temps de barbotage d'air.

Le graphique II est la représentation du même phénomène en remplaçant les potentiels en millivolts par la valeur correspondante en rH_2.

Les graphiques III et IV sont les représentations logarithmiques des mêmes expériences. Ceci en vue de faire ressortir la partie logarithmique des courbes qui pourrait être due à des potentiels mixtes oxygène-réducteur, les parties non logarithmiques pouvant correspondre à des potentiels vrais.

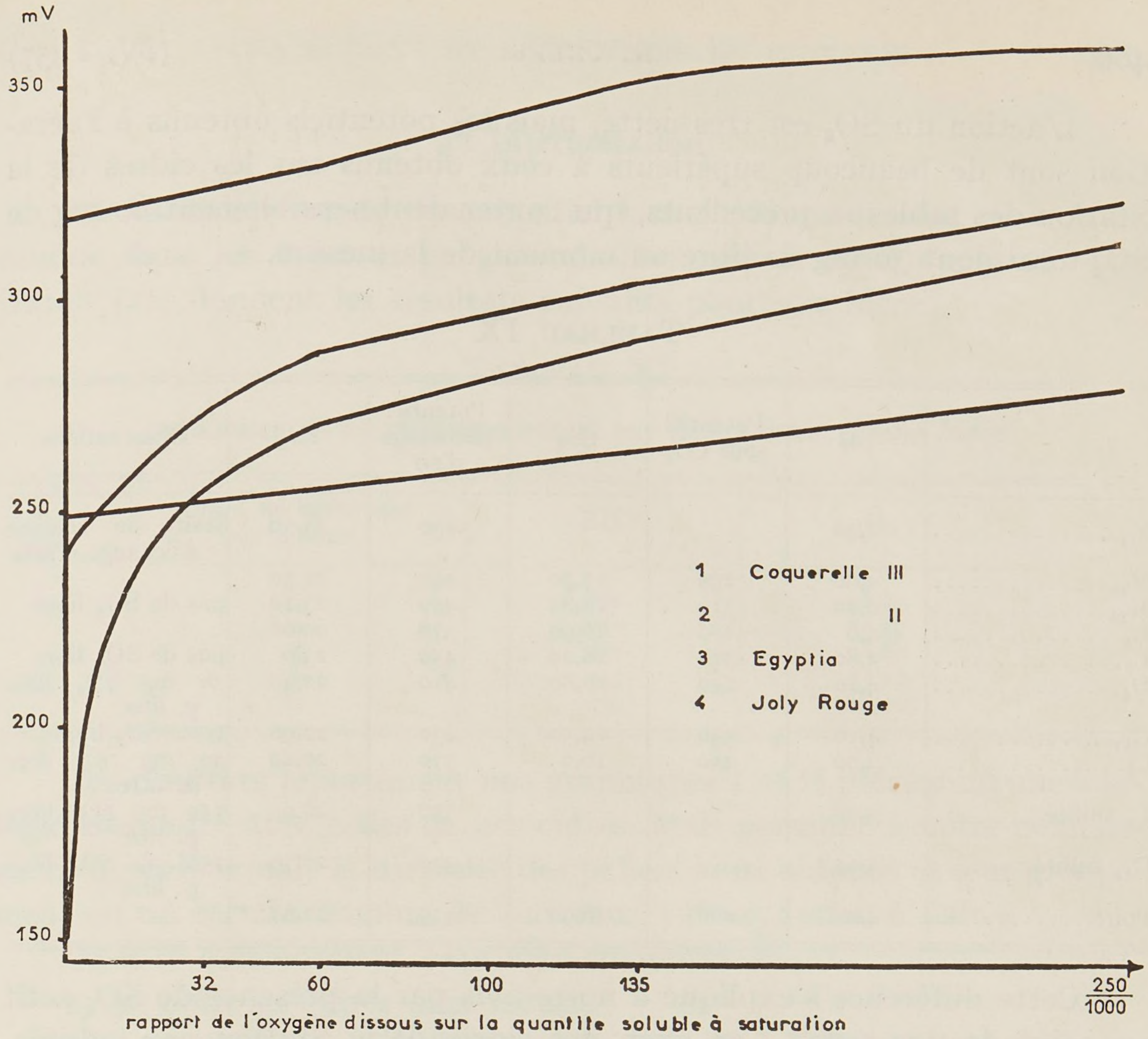
Les graphiques V et VI traduisent quelques résultats du tableau VIII,

exprimés soit en potentiels, soit en rH_2, l'oxydant étant dans ce cas une solution d'eau saturée d'oxygène. On obtient aussi une idée de la variation du potentiel pour des quantités relativement faibles d'oxygène dissous. L'existence de paliers à des rH_2 voisins de 17 et 19 semblerait confirmer l'existence de deux véritables systèmes redox électroactifs dans ces deux zones.

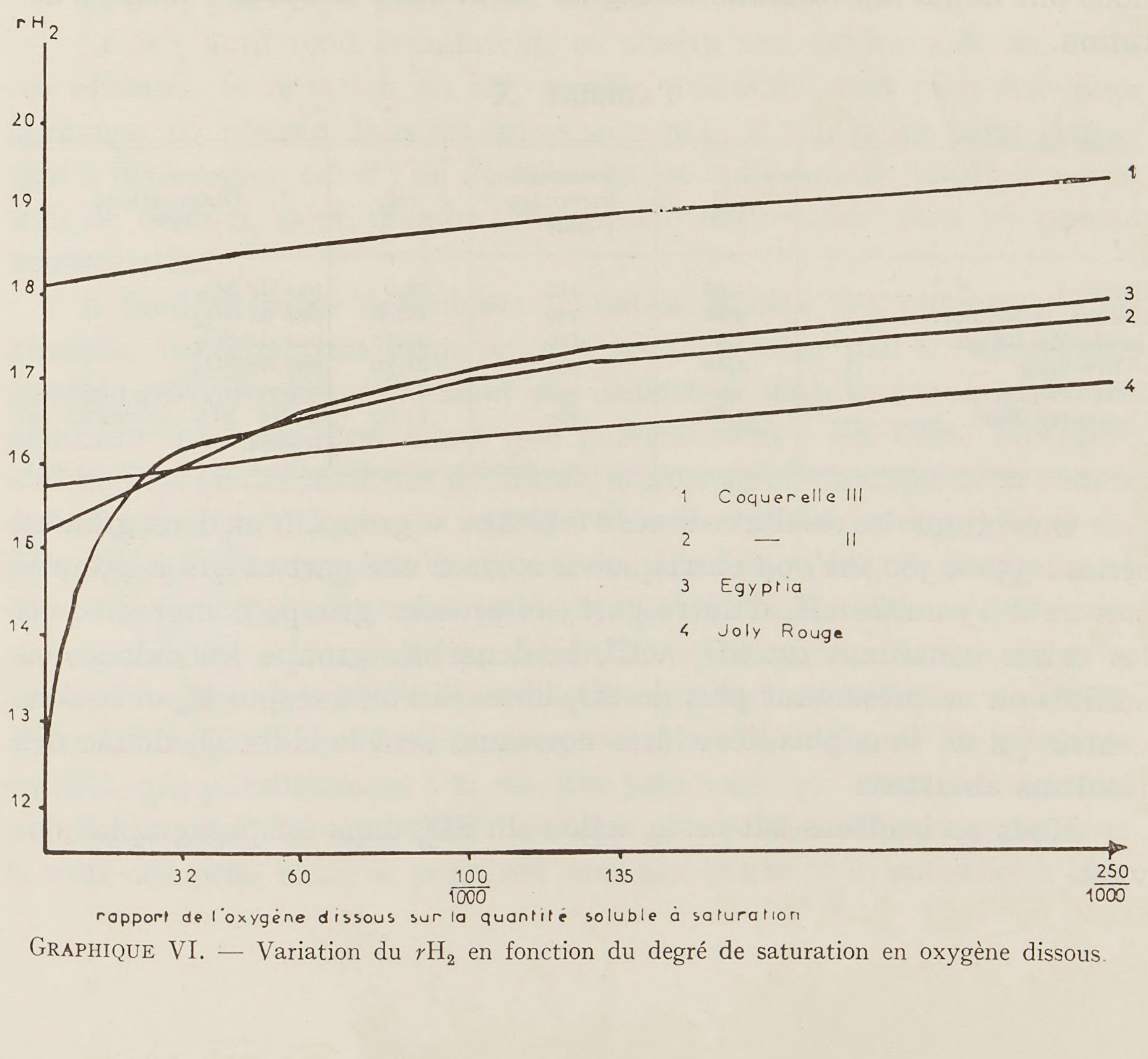


GRAPHIQUE IV. — Représentation semi-logarithmique de la variation du rH_2 en fonction du temps de barbotage d'air.

Nous avons remarqué que dans certains cas, le barbotage de 30 minutes était insuffisant pour atteindre le palier qui apparaît nettement sur ces graphiques. Aussi dans les essais suivants, nous avons prolongé le barbotage jusqu'à 60 minutes. Nous avons de cette façon étudié des cidres commerciaux d'origine industrielle ou paysanne. Dans le tableau IX, nous avons groupé des potentiels de cidres divers en bouteilles, le potentiel étant d'une part mesuré sous gaz inerte et d'autre part après 1 heure de barbotage dans les mêmes conditions que les cidres précédents.



GRAPHIQUE V. — Variation du potentiel en fonction du degré de saturation en oxygène dissous.



GRAPHIQUE VI. — Variation du rH_2 en fonction du degré de saturation en oxygène dissous.

L'action du SO_2 est très nette, mais les potentiels obtenus à l'aération sont de beaucoup supérieurs à ceux obtenus sur les cidres de la Station des tableaux précédents, qui contenaient sensiblement 80 mg de SO_2 total dont 30 mg de libre au moment de la mesure.

TABLEAU IX

	pH	Potentiel sous CO_2	rH_2	Potentiel barbotage d'air	rH_2	Observations
M_4	2,70			530	23,50	traité sur colonne d'échange d'ions
M_{10}	3,90	290	17,70	430	22,50	
M_{14}	4,10	310	18,85	440	23,20	pas de SO_2 libre
L_3	4,0	260	16,90	370	20,60	
L_9	3,80	310	18,20	450	23,0	pas de SO_2 libre
D_4	4,20	240	16,80	410	22,40	30 mg SO_2 libre p. litre
G_{11}	4,10	330	19,50	430	22,90	trace SO_2 libre
C_1	3,80	250	16,0	370	20,20	40 mg SO_2 libre p. litre
L_9 sulfité	3,70			350	20,0	150 mg SO_2 libre p. litre
G_{11} sulfité	4,05			370	20,70	150 mg SO_2 libre p. litre
Poiré	4,0	260	16,90	435	22,80	

Cette différence s'explique à notre avis par la présence de SO_2 actif au point de vue redox : en effet, des cidres de la Station non sulfités, nous ont donné les résultats consignés au tableau X après 1 heure d'aération.

TABLEAU X

	pH	Potentiel barbotage air	rH_2	Observations
Cartignz	4,00	410	22,0	pas de SO_2
Robert de Rennes	3,80	430	22,20	pas de SO_2
Jambe de Lièvre	3,90	420	22,10	pas de SO_2
Petite Sorte	4,10	390	21,50	pas de SO_2
Penn Chopine	4,0	430	22,60	traces SO_2 libre, piqûre
Concentré dilué	4,80	360	21,80	traces SO_2 déacidifié sur resines.

On voit que les résultats de ces 2 tableaux se groupent en deux grandes séries : 350 à 380 mV, ou en rH_2, 20 à 20,70 d'une part et 410 à 450 mV soit 22 à 23 unités rH_2 d'autre part ; le premier groupe comprend tous les cidres contenant du SO_2 actif, le deuxième groupe les cidres non sulfités ou ne présentant plus de SO_2 libre. Si l'on excepte M_4 et le concentré qui ne sont plus des cidres normaux, seul le cidre D_4 donne des résultats aberrants.

Nous reviendrons sur cette action du SO_2 dans un paragraphe suivant.

4° Interprétation.

La variation rapide du potentiel lors de l'introduction d'air était connue dans les boissons en général. HOPKINS et KRAUS signalés par URION (21) donnent les résultats suivants pour une bière.

TABLEAU XI

Influence de l'oxygène dissous sur le potentiel d'une bière

temps de barbotage en minutes	EH	rH_2
0	250	16,80
1	310	18,50
6	422	22,60
16	437	23,10
31	439	23,10

Ces résultats reportés sur nos graphiques I et II présentent une analogie très nette avec celles de nos cidres. Mais personne à notre connaissance n'avait signalé la diversité des paliers ainsi obtenus et leur groupement en un certain nombre de « niveaux « d'oxydation à l'air ».

Ceux-ci atteindraient exprimés en unités rH_2 :

17,50 pour les cidres bien réduits ;

19 pour ceux présentant un rH_2 16 à 17 à l'abri de l'air ;

22 à 23 pour ceux présentant un rH_2 18 à l'abri de l'air.

Le SO_2 actif tend à maintenir ce niveau aux environs de 20. Pour ces niveaux, la notation en rH_2 semble utilisable, sauf peut-être pour le niveau 19, obtenu dans les cidres sans SO_2. Il y a là un point important à déterminer, car si l'un des niveaux est indépendant du pH, la variation de celui-ci, peut prendre une grande importance dans les phénomènes redox.

Il faudrait aussi déterminer la nature exacte des potentiels ainsi mesurés. On admettait jusqu'ici que les potentiels pris à l'air n'étant pas thermodynamiques n'étaient pas utilisables, mais les travaux récents montrent que ceci n'est exact que partiellement : en effet, l'oxygène n'intervient en donnant des potentiels mixtes qu'en fonction de sa courbe de réduction sur l'électrode utilisée. Si cette courbe est reportée à des potentiels peu élevés par le choix judicieux de l'électrode, on peut mesurer des potentiels thermodynamiques en présence d'air au-dessus de la zone correspondante à la courbe de réduction de l'oxygène dissous. Dans ce cas les niveaux ainsi déterminés nous renseignent sur la limite maximum d'oxydation par l'air lors d'une oxydation accidentelle. Il est probable, en effet, que parallèlement à la réaction principale qui « impose » le potentiel, il y a oxydation partielle de corps susceptibles d'être oxydés dans la zone comprise entre le potentiel sous gaz inerte et le potentiel à l'air.

Il est curieux de remarquer l'analogie entre les potentiels ainsi trouvés dans ces cidres et ceux de suspensions de microorganismes. Ainsi KLUYVER et HOOGERHEIDE, cités par INGRAM (17) donnent les résultats suivants pour des levures.

TABLEAU XII

Levures	sous azote		à l'air		QO_2/QCO_2
	EH	rH_2	EH	rH_2	
S. Cerevisae	90	13,50	157	16	0,2
S. Marxianus	99	14	257	19	5,0
Tor. Candida			273	20	7,50
Tor. Dermatitis			284	20,30	11,50

Les levures étaient en suspension dans une solution de glucose à 3 p. 100 dans un tampon phosphate de pH = 5,4.

Dans le même ordre d'idée, M^lle^ COZIC (18) a mesuré les potentiels de suspensions d'acetobacters dans un milieu très aéré par barbotage d'air. Les acétobacters étaient en suspension dans un tampon contenant 3 p. 100 de glucose et 2 p. 100 d'alcool. Elle trouve que pour Acétobacter ranceus, A. pastorianum, A. peroxydans, A. xylinum, le potentiel mesuré se stabilise à 350 mV soit $rH_2 = 23$, pour un pH = 5,50, tandis que pour A. melanogenum et A. suboxydans le potentiel se stabilise à 300 mV, soit $rH_2 = 21$. On peut se demander s'il s'agit seulement d'une simple coïncidence, et si l'on n'a pas tort, lors de l'étude des phénomènes d'oxydation, de raisonner sur les boissons, comme s'il s'agissait de solutions mortes de produits chimiques divers dans de l'eau alcoolisée. Le rôle des microorganismes et de leurs produits d'excrétion a été, à notre avis, trop négligé car ils pourraient jouer un rôle important dans la zone de potentiel qui nous intéresse, comprise entre les rH_2 16 à 23.

Les résultats de KLUYVER et HOOGERHEIDE semblent montrer que le potentiel mesuré est d'autant plus fort que le métabolisme aérobie est plus important. Ceci s'expliquerait sans doute, par la teneur en cytochrome des microorganismes du milieu. On peut se demander si le système le plus important dans cette zone 16 à 23, n'est pas un système cytochromique apporté par les levures.

L'existence du palier que l'on remarque dans la courbe s'expliquerait dans ce cas par l'existence, parallèlement à l'oxydation du cytochrome, d'une réaction de réduction par les réducteurs du milieu aboutissant après un temps d'activation, à un équilibre fonction de la vitesse de fixation de l'oxygène dissous et de la vitesse de réduction des réducteurs du milieu.

On peut envisager par exemple le cycle suivant :

1. Cytochrome réduit $\rightleftarrows$ cytochrome oxydé ;

2. Cytochrome oxydé + réductone réduite ⇄ cytochrome réduit.

La première réaction s'effectuant à l'air en présence de cytochrome oxydase. Le potentiel devient une fonction des vitesses respectives des réactions 1 et 2. Dans le cas où le réducteur du cytochrome oxydé est une réductone, il est bon de rappeler que ces corps se présentent sous deux formes en équilibre :

3. Forme diénolique active ⇄ forme cétonique

et que le facteur limitant de la réaction n'est pas obligatoirement la vitesse de la réaction 2, mais la quantité de réductone active présente, le facteur limite devenant alors la vitesse de la réaction 3. On voit alors que le potentiel mesuré devient fonction de phénomènes très complexes. La nature exacte du potentiel mesuré est fort difficile à distinguer et nécessiterait une étude plus approfondie, utilisant les courbes de polarisation des électrodes. Mais si ce potentiel peut être utilisé dans la prévision des réactions, il en résulte que le pouvoir oxydant de l'oxygène de l'air n'a pas une valeur fixe et constante mais est fonction de la nature du milieu et du système enzyme/substrat susceptible de le fixer.

V. — POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION DES JUS FRAIS

1° Influence de l'aération sur le potentiel des jus frais.

Il était intéressant de suivre de la même façon, le potentiel d'oxydo-réduction de jus frais sortant de presse. Les jus étudiés ne sont pas destinés à l'élaboration de jus de pommes. Ils proviennent de pommes à cidre douces et douces-amères trop peu acides et trop riches en tanin pour l'élaboration de jus non fermentés. MARSHALL (19) a montré que de tels jus donnent des troubles plus importants que ceux des jus de pommes de table ou de pommes aigres, par formation de phlobaphènes insolubles, par polymérisation des tannoïdes.

Ces jus sont les produits de départ pour la fabrication des cidres. Le développement actuel des jus de pommes non fermentés rend intéressante l'étude des jus destinés à la fabrication de tels produits, provenant de pommes aigres ou d'écarts de triage de pommes de table. Dans cet esprit nous avons étudié un jus de pommes de table : la Belle de Boskoop Rouge. Les résultats rappellent ceux obtenus avec les jus précédents, mais il est évident qu'il faudrait expérimenter sur de nombreux échantillons avant de vouloir utiliser ces conclusions.

Les jus sortent très oxydés du pressoir, mais se réduisent rapidement et il est pratiquement impossible de déterminer le potentiel immédiatement à la sortie puisqu'il faut plusieurs dizaines de minutes pour l'équilibrage des électrodes avec le milieu. Ainsi, un jus de la variété Amère de Berthécourt, saturé d'air par barbotage à un potentiel à l'air

de 260 mV qui retombe à 220 mV au bout de 20 minutes et à 190 mV au bout d'une heure si on arrête le barbotage.

Mais si comme dans les cidres, nous faisons barboter de l'air avec la

TABLEAU XIII

	E_H à l'air sans barbotage	Temps en minutes du barbotage d'air				
		60 m	15 m	20 m	30 m	60 m
Gros Doux	390		490			
Amere de Berthecourt.	450		490			520
Amere de Berthecourt moisie	420	530	585		585	590
Grosse Douce Rousse. .	410	460	470	490		540
Grosse Douce Rousse (azote à 1 % d'oxigène	410	440				465
Reine des Pommes	370		515		530	530
Reine des Pommes déféquée	330	385		430		450
Reine des Pommes bouillie	340	360				380
Indéterminée	250	410		470		525
Indéterminée pasteurisée	240	370				400

même installation que précédemment on note une élévation très rapide du potentiel aboutissant assez rapidement à un palier.

Nous avons répété certaines de ces mesures et avons trouvé les mêmes résultats avec une précision suffisante spécialement pour le palier. On peut donc définir pour les jus frais un « potentiel maximum d'oxydation à l'air » analogue à celui des jus. Ces potentiels déterminés après 60 minutes de barbotage sont groupés dans le tableau XIII.

TABLEAU XIV

Variétés	pH	EH	rH_2
Amère de Berthecourt I	3,80	530	25,70
Amère de Berthecourt II	4,10	505	25,40
Amère de Berthecourt moisie	3,80	580	27,20
Reine des Pommes I	3,80	520	25,35
Reine des Pommes II	3,50	545	25,60
Reine des Pommes déféquée	3,80	450	22,90
Reine des Pommes bouillie	3,80	380	20,50
Grosse Douce Rousse	3,70	540	25,80
Grosse Douce Rousse (1 % d'O_2)	3,70	465	23,20
Belle de Boskoop Rouge	3,50	570	26,40
Indéterminés pasteurisé	3,80	400	21,20

La variation des potentiels est extrêmement rapide dans les premières minutes du barbotage.

Les jus frais au sortir de la presse atteignent rapidement par barbotage d'air, des potentiels élevés tendant vers 26 unités rH_2, ou 550 mV. Le fait que les potentiels obtenus dans les jus bouillis ou pasteurisés,

soient nettement inférieurs, indique que ces potentiels élevés sont provoqués par l'action d'enzymes oxydantes, détruites par la chaleur.

On constate d'autre part que le potentiel ainsi obtenu ne se maintient qu'en fonction du barbotage d'air. Si l'on arrête le barbotage le potentiel retombe très rapidement à des valeurs voisines de 23 unités rH_2.

On retombe en 1 heure à 420 mV pour Grosse Douce Rousse et à 440 mV pour Amère de Berthecourt. Nous avons traduit graphiquement ces résultats dans les graphiques VII et VIII.

2° Interprétation.

Le problème qui se pose est le même que précédemment. Le potentiel ainsi mesuré est-il utilisable bien que pris en présence d'air ? Il est bon de remarquer à ce sujet que l'on prend couramment des mesures de potentiels à l'électrode à quinhydrone en présence d'oxygène et qu'il est admis que l'oxygène ne perturbe pas la mesure pour les pH inférieurs à 8 ce qui nous donne des potentiels, par rapport à l'électrode normale, variant de 300 mV à 700 mV. On peut donc admettre que dans ces limites de potentiels, il n'y a pas superposition de réduction de l'oxygène sur l'électrode, donc pas de potentiels mixtes. Le potentiel mesuré peut être un potentiel thermodynamique et il serait bon de l'étudier de très près à l'aide des courbes de polarisation et des techniques que nous avons rappelées dans la première partie.

Le potentiel mesuré serait alors celui d'un système polyphénol-quinone, l'équilibre étant fonction de la vitesse de réaction de l'oxygène activé par l'enzyme et de la vitesse de réduction d'un système réducteur du milieu en présence de la polyphénol-oxydase.

Le potentiel pourrait alors être, sous certaines réserves, utilisé dans la prévision des oxydations et déterminerait en particulier « le niveau maximum accessible » par une oxydation accidentelle. Le système oxyderait proportionnellement à leur vitesse de réaction, tous les systèmes rapides ou lents de potentiel d'équilibre inférieur au potentiel ainsi déterminé.

Si un tel système existe, il devrait apparaître aussi par un dosage électrométrique à l'aide d'un système oxydant réversible et rapide. La valeur relativement élevée du potentiel mesuré nous obligera à utiliser un oxydant assez puissant et le dichlorophénol-indophénol est en particulier inutilisable pour la mise en évidence d'un tel système, par suite de son potentiel trop bas.

Ces résultats permettent d'attirer l'attention sur des faits assez curieux : le potentiel élevé obtenu pour un jus moisi qui pourrait s'expliquer par un système enzymatique différent, peut-être peroxydasique. On retrouve en effet, dans ce cas, un potentiel voisin de celui obtenu

par addition d'eau oxygénée dans les cidres normaux qui présentent tous une réaction positive des peroxydases à la teinture de gaïac et au gaïacol.

L'intervention d'une enzyme semble fort probable si l'on constate que les cidres bouillis ou pasteurisés nous donnent des potentiels beaucoup moins élevés, de l'ordre de 400 mV au lieu de 550 mV.

De même le jus déféqué et soigneusement privé du chapeau semble avoir perdu la majeure partie de son activité enzymatique. Si au contraire l'on disperse le chapeau dans le cidre déféqué on retrouve les potentiels précédents. La protéine de l'enzyme semblerait donc occluse dans le chapeau avec tout l'azote, protéique et polypeptidique. Il y a là un point intéressant à développer, tant pour l'étude des jus que pour celle des cidres doux.

Le jus de pommes de table que nous avons étudié (Belle de Boskoop Rouge) nous donne un potentiel à l'air comparable à celui des jus de pommes à cidre. Mais il faudrait évidemment multiplier ces mesures sur des jus de pommes de table pauvres en tanin, avant d'en tirer des conclusions.

Enfin la pression partielle de l'oxygène semble jouer un rôle important. Le potentiel en présence d'azote contenant 1 p. 100 d'oxygène reste bas, de l'ordre de celui que nous avons noté pour le cidre et imputé à un système cytochrome oxydasique. On retrouverait ici, le fait connu que le système polyphénol-oxydasique, n'intervient que pour des pressions partielles élevées. Aux basses pressions, le système actif serait le système cytochrome-oxydasique.

Nous verrons dans le paragraphe suivant que l'addition de SO_2 produit une variation très importante des courbes et des potentiels mesurés.

Il faut cependant, dans tout ceci, se garder de conclusions trop hâtives et le problème le plus urgent semble être l'étude de la nature exacte des potentiels ainsi mesurés.

VI. — INFLUENCE DU SO_2 SUR LES POTENTIELS MESURÉS VALEUR DE CES POTENTIELS

Nous avons vu dans le cas des cidres, que la présence de SO_2 actif maintient le potentiel mesuré aux environs de 350 mV ou si l'on s'exprime en rH_2 de 20.

Là aussi se pose le problème de la nature exacte du potentiel mesuré, et du mode d'action du SO_2. Le fait que la réaction, sulfite $\rightleftarrows$ sulfate soit irréversible, semble indiquer que le potentiel mesuré n'est pas un potentiel thermodynamique, mais un potentiel du type

$$E_H = \text{constante} + \frac{0{,}058}{n} \log |SO_2|$$

En fait, il est probablement encore plus compliqué et le réducteur actif n'est probablement pas le SO_2 libre, mais simplement l'ion SO_3^{--}, le potentiel étant de la forme

$$E_H = \text{constante} + \frac{0{,}058}{n} \log |SO_3^{=}|$$

Mais ce potentiel n'est pas thermodynamique et ne donne donc aucun renseignement sur le pouvoir réducteur du SO_2.

Le potentiel mesuré dans les cidres, vins ou bières, présentant du SO_2 actif, ne semble donc présenter aucun intérêt et semble être le type du potentiel bien défini, inutilisable pour la prévision des oxydo-réductions.

Cependant le problème là aussi, gagnerait à être étudié car on peut envisager l'existence de composés d'addition quinones-SO_2 par exemple ou cytochrome-SO_2 ayant un potentiel d'équilibre défini. On sait en effet, qu'on peut expliquer l'oxydation de l'anhydride sulfureux en sulfate par la formation d'un composé intermédiaire avec les tannoïdes, l'intervention de ces corps dans l'oxydation du SO_2 apparaît empiriquement et a été mis en évidence pour les cidres par WARCOLLIER et LE MOAL (19) et devient importante si l'on augmente le pH.

Dans le cas des jus en présence de SO_2 libre, on note un phénomène analogue à celui des cidres. Dans les jus arrivés à leur potentiel maximum en présence d'air, l'addition d'anhydride sulfureux aux doses maxima autorisées par la législation, soit 200 mg au litre, provoque une chute immédiate du potentiel mesuré.

De même, si l'on fait barboter de l'air dans un jus fraîchement sulfité, le potentiel se stabilise à une valeur très nettement inférieure à celle obtenue pour le jus non sulfité. Cette action de l'anhydride sulfureux disparaît assez rapidement et pour certains cidres elle n'est plus sensible au bout de 24 heures de contact. Le jus se comporte alors comme un jus non sulfité, le SO_2 actif a disparu, soit par combinaison, soit par oxydation, le mécanisme exact dans les jus n'étant pas encore élucidé.

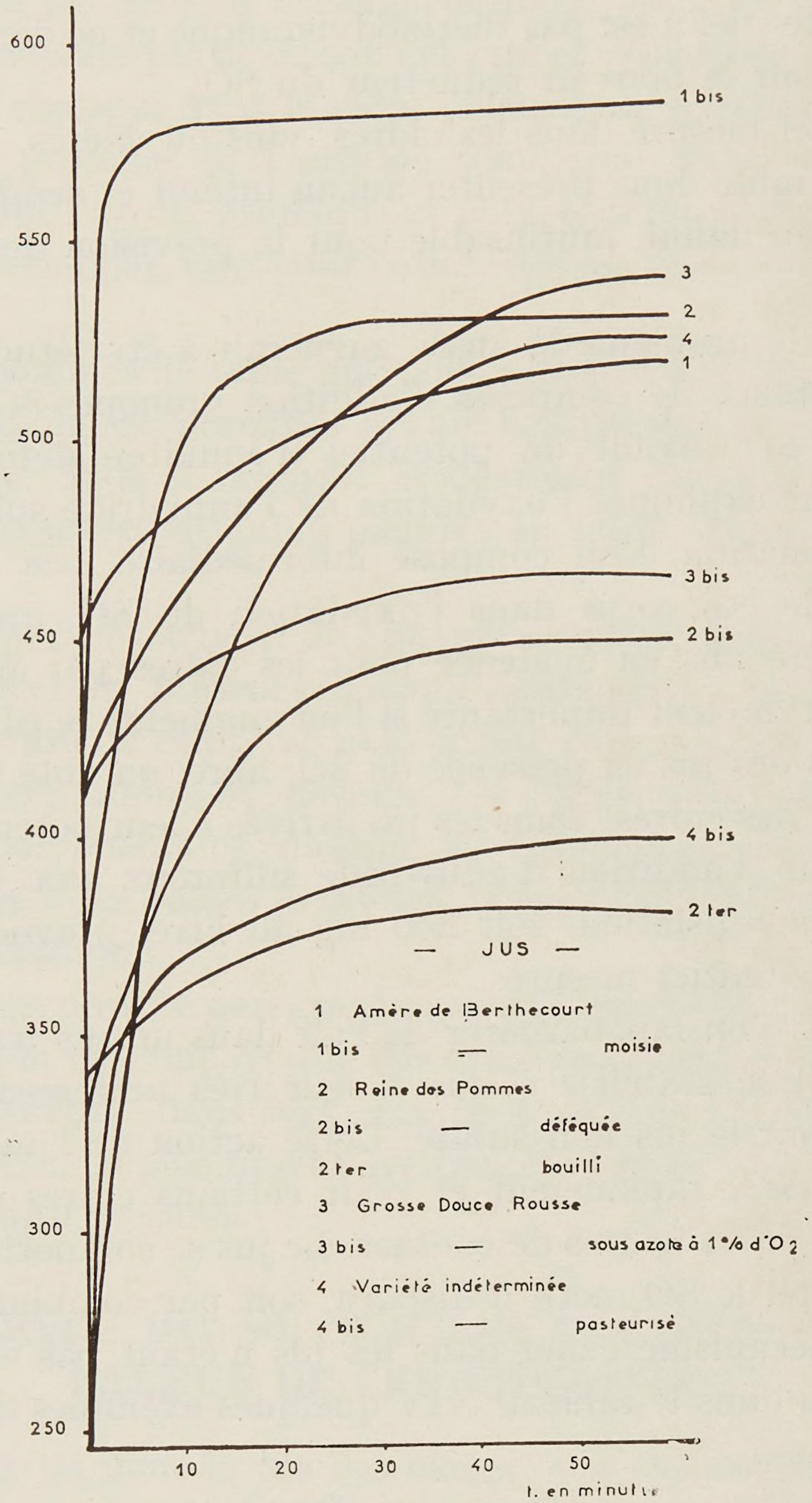
On trouvera dans le tableau XIV quelques exemples de cette action du SO_2 sur les jus.

TABLEAU XV

potentiels en mV de Jus sulfités aérés

Variétés	sans SO_2	addition de SO_2 immédiate	aération après contact de 24 heures avec SO_2	aération après contact de 5 jours avec SO_2
Amère de Berthecourt moisie.	580	430		
Amère de Berthecourt pH = 4,10	500	440	500	
Reine des Pommes I	520	430	510	520
Grosse Douce Rousse	540	435		

Nous avons figuré quelques-unes des courbes obtenues avec des jus sulfités sur les graphiques VII et VIII. On retrouve ici un fait connu, l'inhibition de l'activité des polyphénoloxydases par l'anhydride sulfureux mais ces résultats ne nous apportent aucun renseignement supplémentaire sur le mécanisme de cette action et sur le véritable pouvoir



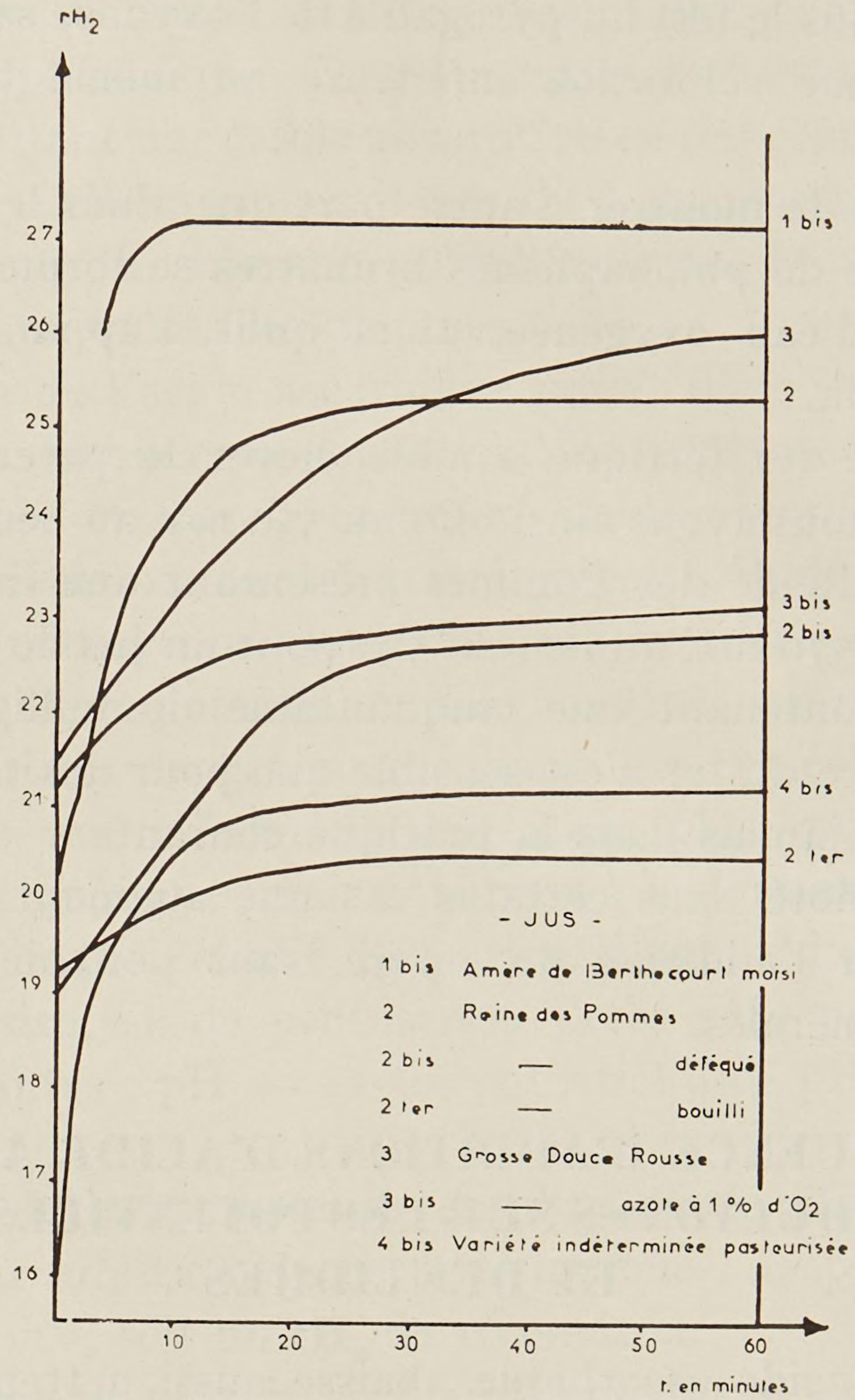
GRAPHIQUE VII. — Variation du potentiel en fonction du temps de barbotage de l'air dans des jus.

réducteur du SO_2. Comme d'autre part le SO_2 donne avec le dichlorophénol-indophénol un produit d'addition incolore, l'I. T. T. n'est pas utilisable, du moins tel quel dans les boissons sulfitées. En effet, dans de telles boissons, le temps de réduction de l'indophénol n'est pas fonction du pouvoir réducteur du milieu, mais surtout de la vitesse de fixation du SO_2 sur l'indophénol. L'abaissement très net du potentiel que l'on note lors de l'étude potentiométrique de la réaction indophénol-SO_2,

n'est pas imputable au pouvoir réducteur du SO_2, mais à la formation d'un système :

indophénol $\rightleftarrows$ leucodérivé sulfité,

de potentiel bas.



GRAPHIQUE VIII. — Variation du rH_2 en fonction du temps de barbotage d'air.

Il en résulte que avant d'être utilisé dans les boissons sulfitées, l'I. T. T. devra être modifié de telle sorte que le SO_2 soit bloqué sans que le système naturel soit touché. Il est curieux de constater que malgré la tendance en brasserie, à sulfiter les bières, on utilise quand même dans bien des cas, l'I. T. T. comme test de stabilité. Un I. T. T. bas obtenu dans ce cas ne nous paraît pas une garantie suffisante. Nous envisageons de revoir cette question en essayant de mettre au point un I. T. T. modifié, utilisable dans les boissons sulfitées.

VII. — INFLUENCE D'ADDITIONS D'EAU OXYGÉNÉE, DE FER ET DE CUIVRE SUR LES POTENTIELS MESURÉS A L'AIR

Nous avons rajouté à deux échantillons aérés des jus précédents une petite quantité d'eau oxygénée : dans les deux cas, le potentiel s'est

élevé et a atteint une valeur voisine de 600 mV qui recoupe celle donnée dans les bibliographies classiques pour les milieux contenant de l'eau oxygénée. Nous rappellerons à ce sujet, que nous avons toujours obtenu dans les cidres un test positif de peroxydase à la teinture de gaïac et que dans tous les jus le test au pyrogallol de l'oxydase sans eau oxygénée donne toujours une coloration inférieure au même test en présence d'eau oxygénée.

Il est curieux de montrer d'autre part que, dans les jus ou dans les cidres, le précipité de phlobaphènes brunâtres se forme immédiatement après l'addition d'eau oxygénée, alors qu'il n'apparaît pas toujours par simple aération.

L'addition de fer ferrique semble élever le potentiel obtenu par barbotage d'air : nous avons ainsi obtenu 550 mV au lieu de 520, pour un jus de la variété Reine des Pommes présentant une casse ferrique très nette et de même 570 mV au lieu de 530 pour un jus de la variété Amère de Berthecourt contenant une cinquantaine de milligrammes de fer. Mais cette influence du fer n'est sensible que pour des teneurs en fer qui ne se rencontrent jamais dans la pratique courante.

Nous avons noté dans certains cas une augmentation notable du potentiel aéré par l'addition de cuivre, sans pouvoir encore en tirer des conclusions générales.

VIII. — INFLUENCE D'ADDITIONS D'ACIDE ASCORBIQUE ET DE RÉDUCTONES SUR LES POTENTIELS DES JUS ET DES CIDRES

L'addition d'acide ascorbique abaisse aussi nettement le potentiel des jus, que des cidres aérés, ainsi qu'il apparaît des quelques résultats du tableau XVI.

TABLEAU XVI

	aéré	+ acide ascorbique
Jus Belle de Boskoop Rouge	570	280
Jus Blanc Mollet	510	200
Cidre cmmerciale	430	310

Cette chute de potentiel s'effectue dans tous les cas en 2 temps : une chute très rapide jusqu'à 400 mV environ, une chute beaucoup plus lente ensuite.

Nous avons constaté avec surprise que dans le jus de Belle de Boskoop Rouge, jus de pommes de table pauvre en tannoïdes, l'addition n'était suivie d'aucune manifestation immédiate sur le potentiel, mais que la chute devenait très rapide si l'on ajoutait une trace de cuivre ou de pyrocatéchine.

L'addition du cuivre se justifie par le fait que l'acide ascorbique n'est pas vraiment auto-oxydable, mais s'oxyde par catalyse métallique ou enzymatique.

L'addition de pyrocatéchine tendrait à faire penser que la non oxydation de l'acide ascorbique dans le jus peut être due à une insuffisance du substrat polyphénolique. Ce qui confirmerait certaines observations sur des jus présentant une faible absorption en oxygène mesurée à l'appareil de Warburg. Celle-ci ne serait pas du à un manque d'enzyme, mais à une insuffisance du substrat polyphénolique, la polyphénoloxydase se retrouvant dans toutes les pommes.

L'utilisation de l'acide ascorbique paraît donc intéressante. Cependant il ne faut pas oublier que son oxydation catalysée par le Cu donnerait de l'eau oxygénée et que le complexe acide ascorbique/eau oxygénée aurait des propriétés oxydantes très élevées. L'étude du potentiel dans un cidre auquel nous avons ajouté de l'eau oxygénée et de l'acide ascorbique nous a donné un potentiel normal : 340 mV soit un rH_2 peu différent de 19. Il est curieux de noter cependant que cet échantillon a pris en quelques heures une coloration nettement plus rouge que celle qu'il avait au départ, qu'on pourrait attribuer à la formation d'anthocyanes.

Nous avons aussi étudié l'addition d'une réductone commerciale obtenue par hydrolyse de pentosanes. Cette pâte présentait les caractéristiques suivantes : pH = 11,50, potentiel à ce pH : — 670 mV, soit $rH_2 \# 9$.

Dans une solution tamponnée de phtalate de pH = 4, celui-ci a été porté à 6,30 par addition de cette réductone : le potentiel était cette fois de : — 140 mV, soit un rH_2' de 16 environ.

La réductone présentait un double pouvoir réducteur : l'un, rapide, comparable à celui de l'acide ascorbique qui disparaît si l'on opère la dissolution sans précautions à l'air, l'autre lent, difficile à évaluer.

Un cidre de pH = 4,20 et potentiel = 350 mV soit rH_2 20,50 traité par cette réductone a donné un pH = 4,30 et un potentiel de 250 mV, soit rH_2 16,90.

L'utilisation d'un tel produit n'est pas légale, mais l'on voit que son pH élevé limite son utilisation car il est peu recommandé d'élever le pH des cidres. D'autre part, l'aspect, le goût et l'odeur de ce produit sont assez peu agréables. Il faudrait pour l'utilisation en cidrerie un produit plus acide, moins coloré, sans odeur ni goût.

IX. — POTENTIELS MESURES DANS DES CIDRES FRAMBOISES

Pour certains, le framboisé ne serait pas une maladie d'oxydation, mais une maladie provoquée par un microorganisme anaérobie, qui fermentant le glucose, avec des rendements comparables à ceux des

levures, donnerait des quantités supérieures d'éthanal. Ce métabolisme se caractériserait par un rH_2 bas voisin de 6 et 7.

Nous n'avons pour notre part jamais trouvé de tels potentiels dans des cidres framboisés sauf en cas d'empoisonnement des électrodes. Il est vrai, que les cidres framboisés que nous nous sommes procurés avaient dépassé le stade d'élaboration de ce trouble. Ils présentaient dans l'ensemble des potentiels de cidres réduits s'étageant de 210 mV à 310 mV soit des rH_2 de 14,20 à 17,70.

Ces cidres aérés par barbotage comme précédemment, atteignent des potentiels à l'air très élevés, rappelant ceux des cidres piqués. On trouvera dans le tableau XVII quelques résultats sur de tels cidres.

TABLEAU XVII

	sous azote		barbotage d'air	
Cidre framboisé Station	280	rH_2 = 17,40	440	rH_2 = 22,70
Cidre framboisé industriel n° 1...	310	rH_2 = 18,30	450	rH_2 = 23
Cidre framboisé industriel n° 2...	310	rH_2 = 18,40	450	rH_2 = 23,10

Les cidres framboisés présentent donc à l'état réduit des potentiels normaux de cidres en fermentation et à l'état oxydé des potentiels de cidres piqués. Ceci confirmerait l'hypothèse de la symbiose levures-bactéries dans cette maladie.

X. — CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nous concluerons avec GRAY et STONE que les mesures de potentiels sont illusoires si l'on veut interpréter tous les résultats trouvés en potentiométrie. On sait en effet actuellement qu'il existe de nombreux potentiels non thermodynamiques donnant des valeurs fixes lors des mesures potentiométriques.

Mais on peut actuellement classer les potentiels ainsi mesurés et éliminer ceux qui ne sont pas thermodynamiques, donc inutilisables pour la prévision des phénomènes d'oxydation et de réduction.

Les courbes de polarisation sont en particulier d'un grand intérêt dans cette distinction. La mesure de potentiel devient dès lors intéressante si on la complète par une étude de la nature du potentiel mesuré.

Nous nous sommes penchés d'autre part sur la recherche du système qui fixe l'oxygène dissous dans les boissons.

Ces systèmes qui se manifestent, à notre avis, dans les courbes de variation du potentiel en fonction du barbotage à l'air seraient de trois ou quatre sortes :

— un système agissant à des potentiels peu élevés et oxydant soit directement, soit par catalyse ou par une action enzymatique les réducteurs diénoliques ;

— un système agissant par une enzyme du type cytochrome oxydase sur un système cytochromique provenant de la levure ;

— un système très actif dans les jus, de nature polyphénoloxydasique, agissant sur certains tannoïdes du jus.

Le problème de la fixation de l'oxygène pourrait avoir à notre avis une grande importance dans les phénomènes d'oxydation des boissons.

Au point de vue technique, nous rappellerons que les mesures de potentiel d'oxydo-réduction sont très délicates et nous ne pensons pas qu'elles puissent être utilisées dans un proche avenir dans la pratique industrielle. Elles restent encore au stade du laboratoire de recherches.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) CREFF (R.) et JACQUIN (P.). — Oxydations et réductions en cidrerie. 1er mémoire, *Ann. Techn.*, I. N. R. A., n° 2, 141-167, 1955.

(2) DEIBNER (L.). — *a*) Recherches sur les techniques de mesure du potentiel d'oxydo-réduction dans les jus de raisin et les vins. *Ann. Techn.*, I. N. R. A., n° 1, 31, 1956. — *b*) Rôle du potentiel d'oxydo-réduction et de la nature des différents systèmes oxydo-réducteurs pendant les transformations et la maturation des vins. *Revue des fermentations et des industries alimentaires*, n° 1, 7-16, n° 2, 47-60, 1953.

(3) GRAFF (Y.). — Le potentiel d'oxydo-réduction. Application des notions d'oxydo-réduction à la brasserie et à l'œnologie. *Annales Nutrition et Alimentation*, n° 4, 253-294, 1950.

(4) RIBEREAU-GAYON (J.). — Contribution à l'étude des oxydations et des réductions dans les vins. (Thèse Bordeaux, 1931.)

(5) GRAY (P.) et STONE (I.). — Oxidation in beers. A simplified method for measurement. *J. Inst. Brewing*, n° 45, 253, 1939.

(6) KEPES (A.). — L'oxydo-réduction en fermentation. *Chimie et Industrie*, septembre, n° 3, 426-434, 1954.

(7) BÉZIERS (Mlle D.). — Étude électrochimique de l'ion ferrique et de ses complexes. (Thèse Paris, 1945.)

(8) GAUGIN (R.). — *a*) Propriétés réductrices des ions thyocyanique et cyanhydrique. Remarques sur les potentiels d'oxydo-réduction des systèmes irréversibles. (Thèse, Paris, 1949). — *b*) *Ann. Chimie*, n° 4, 832, 1949.

(9) COURSIER (J.). — *a*) Utilisation des courbes de polarisation en chimie analytique. (Thèse Ingénieur-Docteur, Paris, 1953). — *b*) Interprétation des mesures potentiométriques au moyen des courbes de polarisation. *Analytica Chimica Acta*, juillet, **7**, n° 1, 77-94, 1952.

(10) CHARLOT (G.). — *Bulletin Soc. Chim. France* (mémoires), 339, 1943.

(11) DUYCKAERTS (G.). — Aperçu général sur quelques développements récents concernant l'interprétation des méthodes d'analyse électrotitrimétriques. *Industrie Chimique belge*, **18**, n° 8, 795-808, 1953.

(12) BARAUD (J.). — Études des dérivés naturels de l'acide tartrique. (Thèse Bordeaux, 1954.)

(13) TAVERNIER (J.) et JACQUIN (P.). — La vitamine C dans la pomme et les produits dérivés de la pomme. *Bulletin Association Chimistes*, n° 3-4, 111, 1946.

(14) MASQUELIER (J.). — Identification et dosage du facteur vitaminique P dans diverses boissons fermentées. *Bulletin Soc. Chim. Biol.*, **38**, n° 1, 65-70, 1956.

(15) PALACIOS (Y.) et VECINO (J.). — Adsorcion, canje de cationes y corrosion

metalica. III. Influencia de la fase gaseosa sobre el potencial del platino en diferentes electrolitos. *Rev. Fis. y Quimica*, n° 7-8, 501-512, 1953.

(16) D'ALMEIDA (H.). — Contribuçao para o estudo dos fenomenos de oxidaçao-reduçao no vinho do Porto. *Annaïs do Instituto do vinho do Porto*, 1952.

(17) INGRAM (M.). — An Introduction to the Biology of Yeasts 1955. Pitman éditeur, Londres, 89.

(18) COZIC (M^lle^ M.). — Contribution à la connaissance des potentiels d'oxydo réduction provoqués par le métabolisme des bactéries acétiques. *Revue générale Botanique*, **48**, 141, 1936.

(19) MARSHALL (C. R.). — Oxidation in apple juices I. J. *Sci. Food Agric.*, July, 1951.

(20) WARCOLLIER (G.) et LE MOAL (A.). — Dosage de l'acide sulfureux dans les moûts de pommes et dans les cidres. *Ann. Falsif. et Fraudes*, juin, n° 246, 1929.

(21) URION (E.). — Oxydo-réductions. *Brasserie*. Mars-avril, n° 90-91,49-58, 72-83, 1954.

TABLE DES MATIÈRES DE L'ANNÉE 1957

I. — MÉMOIRES ORIGINAUX

Domercq (**Mlle S.**). — Étude et classification des levures de vin de la Gironde 5
Poisson (**Mme J.**) **et Guilbot** (**A.**). — Microflore des farines françaises. Composition et évolution 59
Causeret (**J.**), **Hugot** (**Mlle D.**) **et Flanzy** (**M.**). — Alcool éthylique et métabolisme azoté. II. Influence de l'alcool dilué et d'un vin naturel sur l'utilisation physiologique de l'azote alimentaire chez le rat 83
Dupuy (**P.**). — Une nouvelle altération bactérienne dans les vins de liqueur 93
Cherel-Touchefeu (**Mme J.**) **et Tavernier** (**J.**). — Sur la substitution éventuelle de l'inversion diastasique à l'inversion chimique, dans le dosage du saccharose 103
Chevalier (**R.**), **Fournaud** (**Mlle J.**), **Lefebvre** (**Mme E.**) **et Mocquot** (**G.**). Mise en évidence des streptocoques lactiques inhibiteurs et stimulants dans le lait et les fromages. Fréquence de ces streptocoques dans le lait cru et les fromages fermiers produits dans différentes régions de France 117
Domercq (**Mlle S.**). — Étude et classification des levures de vin de la Gironde (2e partie) 139
Ribereau-Gayon (**J.**) **et Gardrat** (**J.**). — Application du titrage potentiométrique à l'étude du vin 185
Dupuy (**P.**). — Les acétobacter du vin - identification de quelques souches 217
Galzy (**P.**) **et Dupuy** (**P.**). — Perspectives d'utilisation d'une levure mutante à la canavanine pour le contrôle du levurage .. 235
Garnier (**J.**). — Étude de la libération d'azote non protéique par la présure dans le lait de différentes espèces animales 245
Ournac Mlle A.) **et Flanzy** (**M.**). — Localisation et évolution de la Vitamine B^1, dans le raisin au cours de la maturation. 257
Lamazou-Betbeder (**Mlle**) **et Pech** (**Mme**). — Observations sur la maturité d'un raisin de table 293
Peynaud (**E**). **et Lafourcade** (**Mlle S.**). — Teneurs en pyridoxine des vins de Bordeaux 301
Hermier (**J.**). — Une méthode rapide de détection de la non stérilité éventuelle d'échantillons de lait chauffé au-dessus de 100° 377

Dupuy (**P.**). — Les facteurs de développement de l'acescence dans le vin 391
Raibaud (**P.**). — Mise en évidence d'une fixation de la Nisine sur les cellules d'une bactérie thermophile utilisée pour le dosage de cet antibiotique 409
Deibner (**L.**) **et Bénard** (**P.**). — Effets des traitements thermiques à l'abri de l'air sur les qualités des vins doux naturels 421
Jacquin (**P.**) **et Cherel** (**Mme J.**). — Évolution des principaux constituants de la Poire à poiré au cours de la croissance du fruit . 429
Creff (**R.**). — Oxydations et réductions en cidrerie (III) 461

II. — DOCUMENTATION

Deibner (**L.**). — Modifications du potentiel oxydoréducteur au cours de l'élaboration des vins de différents types 313
Deibner (**L.**). — Évolution du potentiel oxydoréducteur au cours de la maturation des vins 347
Deibner (**L.**). — Effet de différents traitements sur le potentiel oxydoréducteur des vins au cours de leur conservation 363

Le Directeur-Gérant : B. LACLAVIÈRE.

Imprimerie BUSSIÈRE à Saint-Amand (Cher), France. — 14-1-1958.

Dépôt légal : 1er trimestre 1958 *N° d'impression : 598*